

N.CHELEMEN

**Anemia
infecțioasă
ecvină**

Editura Ceres

Dr. NICOLAE CHELEMEN

8. IX 1984.

Shan

Anemia infecțioasă ecvină



Editura Ceres
București — 1981

PREFAȚĂ

Prof. dr. doc. N. STAMATI

Am primit cu multă plăcere invitația de a prefața cartea de față. Nu mă îndoiam nici o clipă că ea va corespunde tuturor exigențelor, căci urmăresc de mult timp activitatea autorului și știu cu cât entuziasm, cu cât elan, cu câtă dăruire a făcut o serie de investigații privind anemia infecțioasă ecvină. Este o viroză interesantă nu numai prin aceea că afectează un animal atât de îndrăgit de oamenii din toate timpurile, dar și prin aspectele sale particulare în raport cu alte viroze umane sau animale.

Lectura textului nu a făcut decît să-mi confirme previziunile și chiar să le depășească. Într-adevăr, lucrarea conține tot ceea ce ar putea interesa pe specialiști, atât din punct de vedere practic, cît și teoretic : date multiple și dintre cele mai actuale cu privire la morfologia și biologia virusului, la structura sa antigenică, la procesele sale de variabilitate etc. Infecția este prezentată pe larg și sub toate aspectele : clinic, anatomo-patologic, epizootologic etc.

O atenție deosebită a acordat autorul diagnosticului bolii, atât clinic, cît și de laborator, insistînd în mod special asupra metodelor imunologice care se folosesc larg în prezent, ele dînd rezultate de o mare precizie. Este prezentată apoi răspîndirea bolii în diverse țări ale lumii și bineînțeles și în țara noastră. Măsurile de prevenire și combatere s-au bucurat de o atenție deosebită din partea autorului.

În prezent, în condițiile crizei mondiale de energie, calul este reconsiderat, astfel că dezvoltarea șeptelului ecvin a căpătat noi valențe și perspective. De aceea, protejarea lui de cea mai gravă boală care îl amenință — anemia infecțioasă — este o cerință și totodată un imperativ al momentului. Astfel, cartea

de față este binevenită, ea înscriindu-se în contextul cerințelor actuale și de perspectivă pentru păstrarea și valorificarea la maximum a șeptelului național ecvin.

Nu pot să închei această prefață înainte de a-mi manifesta bucuria că strădaniile depuse de autor pentru valorificarea unei îndelungate activități în domeniul respectiv, prilejuiesc cititorilor de astăzi cunoașterea realizărilor practice și teoretice prin această valoroasă lucrare.

Prof. dr. doc. N. STAMATIN

1. GENERALITĂȚI

1.1. DEFINIȚIE

Anemia infecțioasă ecvină (A.I.E.) este o infecție virală, specifică solipedelor (cal, asin, catir, bardou), care evoluează enzootic sau sporadic, mai rar epizootic, în formă supraacută (foarte rar), acută, subacută, cronică și latentă.

Boala se caracterizează clinic prin febră recurentă sau intermitentă, viremie persistentă, anemie și slăbire progresivă, iar morfopatologic prin diateză hemoragică, leziuni cardio-vasculare, hepatice, splenice și renale. Un animal o dată infectat rămâne viremic pentru toată viața.

Anemia infecțioasă ecvină este răspândită astăzi în aproape toate țările lumii. În 1950 a fost semnalată pentru prima dată și în țara noastră (272).

Considerată ca cea mai importantă și dificilă boală infecțioasă a calului (135), A.I.E. cauzează pagube considerabile patrimoniului ecvin din diverse țări. Rata letalității poate depăși 30% iar morbiditatea ajunge uneori pînă la 80% (236).

1.2. TERMINOLOGIE INTERNAȚIONALĂ

Anemia infecțioasă ecvină (*anaemia infectiosa equorum*) figurează în numeroasele publicații de specialitate, din țară și străinătate, sub diverse denumiri :

— în România boala este intitulată „anemia infecțioasă a calului” (238) sau „anemia infecțioasă a solipedelor” (345) ;

— bibliografia franceză o înscrie ca „l'anémie infectieuse des équidés (maladie de Vallée)” ;

— publicațiile în limba anglo-saxonă o numesc „equine infectious anaemia” (swamp fever, river bottom disease) ;

— literatura de specialitate germană o intitulează „Ansteckende Blutarmut der Einhufer (Infectiöse Anämia der Pferde)” ;

— în Italia, boala este cunoscută ca „anemia infettiva del cavallo“ ;

— bibliografia în limba spaniolă o înscrie ca „anemia infecciosa equina“ ;

— lucrările în limba rusă o denumesc „infektionnaia anemia loşadei“.

Deşi nu este decît parţial corespunzătoare, denumirea de „anemia infecţioasă ecvină“ sau „anemia infecţioasă a calului“ s-a impus de-a lungul vremii, ea figurînd în toate publicaţiile internaţionale, în lucrările de specialitate, legi, decrete, statistici etc. (188). În cadrul contextului, noţiunea de „anemie“ este improprie, întrucît „sindromul anemic“ este pasager şi nespecific (85) ; este prezent în formele clinice dar lipseşte în stadiul latent care este cel mai larg reprezentat în cazuistica A.I.E.

1.3. ISTORIC

Anemia infecţioasă ecvină a fost prima dată recunoscută ca formă clinică în Europa (Franţa) în anul 1843 de către L i g n é e (156), C h a r l i e r (38) şi D e n o c (52). După această dată, A.I.E. este diagnosticată rînd pe rînd în : Canada (1830), Elveţia (1880), Germania (1886), Japonia (1893), S.U.A. (1896), Suedia (1901), Cehoslovacia (1929), U.R.S.S. (1932), Iugoslavia (1934), România (1950), Bulgaria (1951), Australia (1959), Grecia (1960) etc.

Cu toate că A n g i n i a r d (5) i-a stabilit caracterul contagios încă din 1859, A.I.E. a constituit multă vreme subiectul a numeroase controverse pe această temă, fiind considerată cînd o avitaminoză B (2), cînd afecţiune alimentară (71), sau o hematopatie (77). Caracterul necontagios al A.I.E. a fost susţinut în U.R.S.S. pînă în anul 1950, afirmîndu-se că este inutilă izolarea animalelor suspecte de boală şi lipsită de logică neutilizarea cabalinelor anemolatente la muncă (133).

Primul studiu ştiinţific al A.I.E. a fost iniţiat de către V a l l é e şi C a r r é (324) în 1904 cînd s-a stabilit că boala este produsă de un virus filtrabil, precizîndu-se totodată modalităţile de contaminare, de instalare a imunităţii prin suprainfecţie şi măsurile de profilaxie (71).

Datorită pierderilor economice considerabile, A.I.E. a început să intre tot mai mult în preocuparea departamentelor statale, a practicienilor şi colectivelor ştiinţifice. Merită a fi menţionată în acest sens contribuţia adusă de Comisia japoneză pen-

tru cercetarea A.I.E., care, în urma studiului a numeroase focare epizootice în perioada 1910—1914, a reușit să precizeze diversele aspecte de patogenie, transmitere a infecției, diagnostic și imunologie.

Caracterele clinice, epizootologice și morfopatologice ale A.I.E. au constituit rînd pe rînd obiectul a numeroase lucrări științifice, realizate de: Balozet (1923—1943), Fortner și col. (1939—1956), Goret și col. (1953—1974), Ishii și col. (1937—1975), Kobayashi și Kono (1962—1967), Steck (1937—1969), Stein și col. (1935—1956), Watanabe (1960—1966) etc.

Studii monografice valoroase asupra A.I.E. au fost elaborate, mai ales în ultimele 4 decenii, de către: Koleakov (1940), Dreguss și Lombard (1954), Ishii (1963), Goret-Michel-Toma (1968), Jubb și Kennedy (1970), Ishitani (1970), Henson și McGuire (1972), Blood și Henderson (1974), Ishii și Ishitani (1975) și Johnson (1976).

Realizări deosebite în aprofundarea problematicii A.I.E. au înregistrat în ultimele două decenii (1950—1980): Kobayashi (129), care obține primele rezultate în cultivarea virusului A.E.I. pe leucocite de cal, precum și Kobayashi și Kono (130) care definitivează metodologia de cultivare și titrare a virusului pe leucocite ecvine. Aceste rezultate au creat premisele studiului științific al virusului sub raport morfologic, fizico-chimic și imunologic. Ele au stat la baza inițierii diagnosticului serologic a A.I.E., conceput și dezvoltat pe de o parte de Cogins și Norcross (44) cu antigen reprezentat de țesut splenic, provenit de la un ponei infectat acut, iar pe de altă cu antigen preparat „in vitro” pe culturi de leucocite ecvine, de către Nakajima și Ushimi (198). Această excelentă tehnică se află astăzi la baza diagnosticului paraclinic al A.I.E., a instituirii măsurilor de profilaxie și combatere, datorită căreia rata pierderilor ecvine scade continuu acolo unde noua tehnologie de diagnostic a fost introdusă (24).

1.4. RĂSPÎNDIRE GEOGRAFICĂ

1.4.1. PREVALENȚA A.I.E. ÎN DIFERITE STATE

Anemia infecțioasă ecvină este considerată una din cele mai răspîndite și dificile boli ale calului (96). Se apreciază că boala îmbracă un caracter cosmopolit, fiind identificată în aproape

toate zonele geografice ale lumii, începînd de la tropice pînă în regiunile subpolare (60). După datele F.A.O., reproduse de K o l e a k o v (133), în lume sînt contaminate cu virusul A.I.E. cel puțin 28 state, unele dintre acestea (Japonia, Canada, S.U.A., R.F.G., Franța etc.), avînd pînă nu de mult o prevalență ridicată, dar care în ultimele două decenii a scăzut continuu. M ö h l m a n n (188) ilustrează declinul prevalenței A.I.E. în aceste state începînd din 1959, astfel (tabelul 1).

Tabelul 1

Diminuarea prevalenței A.I.E. în unele state în perioada 1959—1966

Statul	Număr de puncte infectate cu A.I.E. în anii :			Obs.
	1959	1960	1966	
Japonia	2 804	2 362	490	
R.F.G.	105	72	7	
R.D.G.	—	53	10	
Australia	4	2	—	
Franța	49	33	2	
Cehoslovacia	15	10	—	
Venezuela	63	58	29	
Iugoslavia	66	39	—	
România	4	—	—	

În ultimul deceniu rata prevalenței A.I.E. continuă să scadă și mai mult. Astfel, în Canada, la un efectiv de 115 000 cai, indicele de infecțiozitate stabilit la 4,7% în 1971 se reduce la 2,9% în 1972 și apoi la 2,3% în 1973 (26); în S.U.A. la 354 412 cai prevalența A.I.E. era în 1974 de 2,5% pentru ca în 1975 să coboare la 1,5%, iar în 1976 la 1,2% (174). La aceasta își aduce contribuția desigur, testul modern de diagnostic imunologic (I.D.-C o g g i n s). B ö h m (20) arată astfel că în R.F.G. începînd din ianuarie 1974 de cînd testul I.D.-C o g g i n s a fost inclus în metodologia de diagnostic a A.I.E. și pînă la sfîrșitul lunii octombrie același an, s-au testat 2 430 cai indigeni din care au fost identificați ca pozitivi 1,57% (totodată s-au testat 277 cai importati al căror indice de infecțiozitate era de 7,9%). În 1978 același autor arată că din 3 257 cai doar 18, respectiv 0,55%, erau pozitivi.

După *l u r o v* și *S o l o g u b* (100), rata prevalenței A.I.E. în diferitele state — așa cum a fost comunicată de diferiți autori — era înainte de 1976 de 3—5% în S.U.A. (*C o g g i n s*) ; 1,4% în Japonia (*N a k a j i m a* și col.) ; 7,5% în Australia (*T h o m a s*) ; 1,2% pentru cai indigeni și 6,2% pentru cai importati în R.F.G. (*B ö h m*) ; 20—30% în unele zone ale Americii centrale (*E d d y*) ; 18% pentru cai P.S. și 26% pentru 1/2 P.S. în Argentina (*P a u l i* și col.) ; 1,6—15% pentru cai importati din diverse țări est-europene în Franța (*T o m a* și col.).

După datele diversilor autori (71 ; 99 ; 155 ; 188), A.I.E. este raportată ca manifestă în următoarele continente și state :

Africa : Republica Sud-Africană, Algeria, Ciad, Eritreia, Etiopia, Maroc, Senegal și Tunisia ;

America Centrală și America de Sud : Argentina, Brazilia, Chile, Columbia, Panama, Paraguay, Peru, Uruguay și Venezuela ;

America de Nord : Canada, Mexic, S.U.A. ;

Asia și Oceania : Australia, Birmania, Coreea, Filipine, India, Indonezia, Japonia — considerată bastionul tradițional al A.I.E. (303), Noua Zeelandă, Papua-Noua Guinee și Vietnam ;

Europa : Anglia, Austria, Belgia, Bulgaria, Cehoslovacia, Elveția, Finlanda, Franța, R.D.G., R.F.G., Grecia, Italia, Iugoslavia, Luxemburg, Norvegia, Olanda, Polonia, Portugalia, România, Spania, Suedia, Ungaria și U.R.S.S.

1.4.2. RETROSPECTIVĂ A.I.E. ÎN ROMÂNIA

În România, A.I.E. s-a răspândit imediat după cel de-al doilea război mondial, ca urmare a staționării trupelor ecvestre ale armatelor beligerante. Primele cazuri de boală au fost diagnosticate de prof. *A d a m e ș t e a n u* în 1950 (1) la o herghelie în care se utilizase ca mijloc de profilaxie specifică ser antigurmos (preparat pe cai anemolatenți) insuficient stocat (237). Între anii 1950—1956 s-au întreprins diverse anchete epizootologice în cursul cărora au fost examinați 152 377 cai, înregistrându-se 19 focare enzootice de A.I.E., care cuprindeau 4 750 cazuri, respectiv 3,1% din populația ecvină examinată (237). Cu această ocazie s-au stabilit și caracteristicile A.I.E. legate de condițiile pedoclimatice specifice țării noastre (237). În același context se înscriu investigațiile în diferite focare epizootice, întreprinse

de Popovici și Jivoiu (237), Jivoiu și col. (109), Surdan și col. (285), Sîrbu (270), Nicolescu și Giurgiu (206) etc.

1.5. PIERDERI ECONOMICE

Anemia infecțioasă ecvină este considerată în Japonia boala care produce cele mai mari pierderi în șeptelul ecvin (135) iar în S.U.A. afecțiunea care amenință cel mai grav creșterea cailor de agrement (120). Pagubele pe care A.I.E. le produce proprietarilor de cai, în special în rîndul cailor de rasă se ridică la sume impresionante ducînd adeseori la ruina financiară a crescătorilor (120). Kittleson (123) arată astfel că în S.U.A., 18 000 cai de rasă au fost sacrificați în cursul anului 1975 și 1976, ca urmare a aplicării legislației în vigoare, cauzînd pagube enorme. Astfel, dacă valoarea unui cal este apreciată la 600 dolari, iar o testare serologică la 12,50 dolari, sumele cheltuite de stat într-un singur an se ridică la 11 025 000 dolari. Numai în primii 4 ani de aplicare a testului I. D.-Coggins, economia S.U.A. a fost prejudiciată de 26 500 000 dolari (123). În același sens, într-o altă lucrare se arată că între anii 1938—1945, Suedia a acordat despăgubiri proprietarilor pentru caii sacrificați din cauza A.I.E., în valoare de 217 000 coroane (2). Aceasta reprezintă doar valoarea de vânzare-cumpărare a acestor cai, dar la care mai trebuie adăugată valoarea ideală pe care proprietarul sau instituția o investește în calul procurat (23).

Dar pierderile economice îmbracă și aspectul scăderii randamentului în activitatea de performanță a cailor din echipele de concursuri, ceea ce de asemenea aduce prejudicii importante proprietarilor și cluburilor sportive. Acest fapt a fost remarcat în 1977 cu ocazia anchetei întreprinse la Royal-Club din Hong-Kong (47), la caii de curse, deosebit de receptivi la infecția cu virusul A.I.E.

O altă categorie de cai care plătesc tribut greu A.I.E. o constituie loturile de ecvine din biofabricile de produse biologice de uz uman și veterinar. Astfel, Möhlmann (188) arată că în decada 1937—1947 carantina profilactică a 4 instituții de seruri și vaccinuri din R. F. Germania a identificat 800 cai cu A.I.E., care fiind sacrificați au constituit deficite economice considerabile în bugetul instituțiilor respective.

Dacă la cele menționate se adaugă că în fiecare focar de A.I.E. circa 30% din efectiv este pierdut prin exitus sau sacrificări și că 80% constituie cifra de morbiditate înregistrată obișnuit, avem o imagine destul de sugestivă a cuantumului pierderilor cauzate de această boală în cadrul diferitelor izbucniri enzoo-epizootice.

Astfel de pierderi apar cu atât mai semnificative cu cât în prezent criza de energie face ca șeptelul național ecvin să fie reconsiderat și dezvoltat.

2.1. CONSIDERAȚII TAXONOMICE

Încadrarea virusului A.I.E. în sistemul de clasificare a virusurilor este subiect mult controversat. Nici în prezent acest virus nu este definitiv clasificat. Dintre propunerile formulate în acest sens, menționăm următoarele:

— Sigmundson (1967) și Nakagaki (1967) consideră că virusul A.I.E. trebuie încadrat în grupa „slow virus infections”, alături de virusul bolii Alvinei a muncilor și de virusurile Virus și Miedel cu care se asemănă în privința caracterelor morfologice;

— Maham et al. (1965) bându-se pe îndul de propagare al virusului A.I.E. în culturile celulare splenice și renale, propune încadrarea acestui virus în grupa oncovirusurilor, alături de alte virusuri, care se multiplică abia în stadiul de celule;

— Maholescu et al. (1969) arată că virusul A.I.E. prezintă unele caracteristici comune cu ale virusurilor leucosice de tip C maeler, ceea ce pledează pentru includerea lui în familia Retroviridae;

— Charnan et al. (1971), analizând caracteristicile fizico-chimice ale virusului A.I.E., prin comparație cu ale altor virusuri din familia Retroviridae (virusul leucemiei murine, Moloney et al. 1964; virusul leucemiei feline — FeLV; virusul

2. ETIOLOGIE

Agentul etiologic al A.I.E. este un virus filtrabil, așa cum au stabilit încă în 1904 Vallée și Carré (324). În acțiunea sa patogenă, virusul dispune de o plasticitate remarcabilă și prezintă o serie de caracteristici morfologice, fizico-chimice și biologice, unele încă incomplet elucidate (312).

2.1. CONSIDERAȚII TAXONOMICE

Încadrarea virusului A.I.E. în sistematică a constituit un subiect mult controversat. Nici în prezent acest virus nu este definitiv clasificat. Dintre propunerile formulate în acest sens menționăm următoarele :

— Sigurdsson (267) și Zakopol (332) consideră că virusul A.I.E. trebuie încadrat în grupa „slow virus infectious“, alături de virusul bolii Aleutine a nurelor și de virusurile Visna și Maedi cu care se aseamănă în privința caracterelor morfologice ;

— Mankamayer și col. (166), bazându-se pe modul de propagare al virusului A.I.E. în culturile celulare splenice și renale, propune încadrarea acestui virus în grupa oncornavirusurilor, alături de alte virusuri, care se multiplică aidoma în astfel de culturi ;

— Manolescu și col. (169) arată că virusul A.I.E. prezintă unele caracteristici comune cu ale virusurilor leucozice de tip C mamifer, ceea ce pledează pentru includerea lui în familia *Retroviridae* ;

— Charman și col. (37), analizând caracteristicile fizico-chimice ale virusului A.I.E., prin comparație cu ale altor virusuri din familia *Retroviridae* (virusul leucemiei murine Raucher = R-Mu LV ; virusul leucemiei feline = Fe LV ; virusul

Visna, Maedi etc.), constată că el prezintă în sucroză o densitate de $1,154 \text{ g/cm}^3$, este similar ca dimensiune cu R-Mu LV, posedă un genom A.R.N. cu greutate moleculară apropiată de a Fe LV (care este precis stabilită la 27 500 daltoni), are o rată de sedimentare de aproximativ 70 S apropiată de a R-Mu LV și conține o componentă polipeptidică identică cu a celorlalte retrovirusuri; de asemenea, el conține în interior o enzimă, revers-transcriptaza, care utilizează matricea poli (rA) a A.R.N.-ului sintetic, dar nu și matricea poli (dA) a A.D.N.-ului sintetic, ambii avându-l pe $(dT)_{12}$ ca primer. Pe baza acestor observații autorii propun încadrarea virusurilor A.I.E. în genul *Lentivirus*, familia *Retroviridae*. Propunerea este susținută de Weil-land și col. (330), Toma (312), Issel și Coggins (103) etc.

2.2. MORFOLOGIA VIRUSULUI

Până nu demult morfologia virusului A.I.E. era puțin cunoscută din cauza posibilităților limitate de a fi cultivat și obținut în cantități suficiente pentru studiu. O dată depășit acest impas prin reușita cultivării lui pe leucocite de cal (130) și apoi prin inițierea și perfecționarea tehnicii de microscopie electronică, s-a putut dezvolta studiul de morfologie al virusului (fig. 1).

Pleomorfic prin definiție, virusul A.I.E. este adesea de formă rotundă, $\varnothing 90\text{—}140 \text{ nm}$ (265), pe fața externă posedând o protuberanță de $6\text{—}8 \text{ nm}$ (312). În interiorul virionului se descrie o viroplasmă și un nucleoid de formă conică sau tubulară în $\varnothing$ de $40\text{—}63 \text{ nm}$ (7 ; 330).

Secționat, virionul se prezintă ca având un înveliș compact, respectiv o capsidă cu dublu contur a cărei simetrie nu a fost încă determinată (107). În celulele infectate pot fi identificate particule virale intracitoplasmice cu structură circulară sau semicirculară care se formează prin înmugurire la suprafața membranei și care se constată adesea și extracelular (fig. 2). Culturile celulare adiționate cu ser imun anti-A.I.E. nu mai permit dezvoltarea acestor particule virale, ceea ce confirmă o dată în plus că ele reprezintă însăși virionii A.I.E. (312).

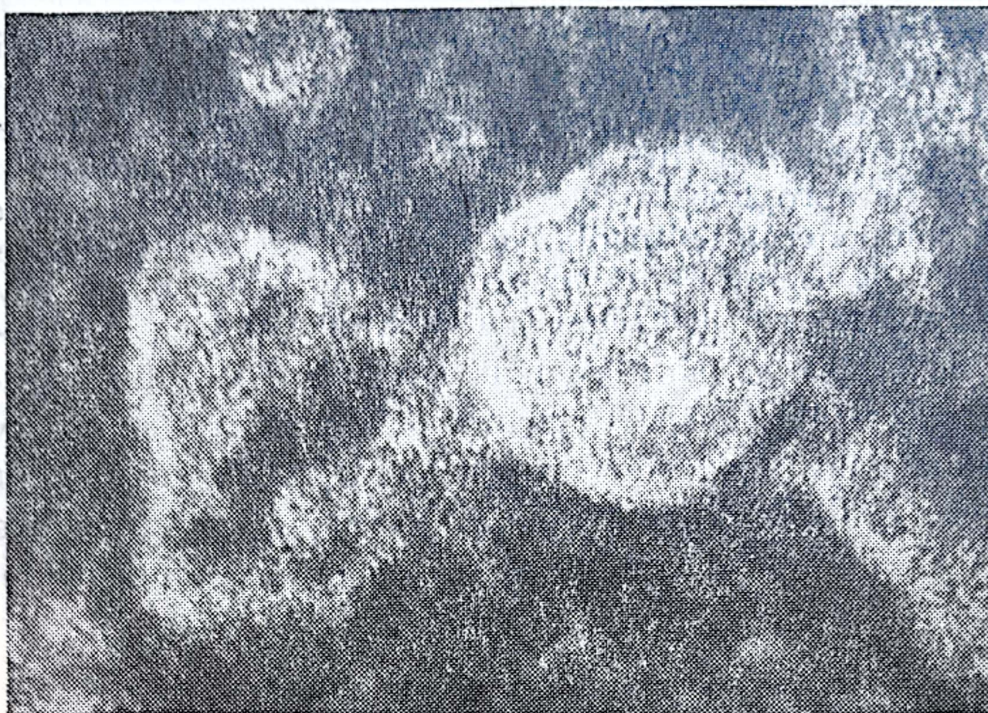


Fig. 1 — Virioni A.I.E. purificați. Colorație negativă cu acid fosfotungstic 2% (după Nakajima și Tajima, 1969)



Fig. 2 — Macrofage cu virus înmugurind (virful săgeții) și particule virale extracelulare. În colț, aspect mărit de virus A.I.E. (după Matheka și col., 1976)

2.3. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSULUI

Nakajima și col. (199) au constatat că învelișul extern viral este alcătuit dintr-o glicoproteină majoră, care reprezintă antigenul filtrabil ca determinantă specifică de tip (141), față de care se formează anticorpii neutralizanți. La rândul lor, Ishizaki și col. (101) observă (pe baza electroforezei Sds-Page) că glicoproteina din stratul extern al virusului este constituită din cel puțin două elemente: unul cu greutate moleculară de 80 000, altul de 40 000 daltoni. La rândul lor Cheevers și col. (42) susțin că în stratul extern al virusului s-au identificat 3 glicoproteine: gp 77/79; gp 64; gp 40. Acestea, împreună cu cele 3 polipeptide neglicozidice a căror greutate moleculară este de 25 000, 14 000 și 11 000 daltoni (101), constituie stratul intern viral care formează 80% din proteina virionică. Restul de 20% reprezintă elemente încă neidentificate, dar în care este inclusă în mod cert o hemaglutinină deosebit de sensibilă la eter și activă față de globulele roșii de cobai (265). Față de componentele neglicozidice ale stratului intern, respectiv față de nucleoproteina care constituie antigenul solubil comun sau de specie (198), se formează în organismul infectat diferiți anticorpi: precipitanți, fixatori de complement etc. (103). Prezența unei transcriptaze inverse, bănuită de Crawford încă din 1972, a fost demonstrată de Charman și col. (37), Nakajima și col. (203), Archer și col. (7), ca făcând parte din masa virusului A.I.E.

Nucleoidul viral este alcătuit din A.R.N., dar pentru replicare, acesta necesită prezența A.D.N. Intrând în detalii de structură, Nakajima și col. (196) arată că în compoziția chimică a virusului A.I.E. intră uridina- H_3 , care este selectiv încorporată în virus, alcătuind rezerva de formare a A.R.N. și tiamina- H_3 care contribuie la obținerea A.D.N. direct din A.R.N. Tupitsyna (316) arată astfel că la caii indemni de A.I.E. valorile A.R.N. sînt substanțial crescute prin comparație cu ale A.D.N. De altfel, multiplele modificări ale fenotipului viral A.I.E. sub forma antigenelor sau mutantelor noi au loc tocmai consecutiv variantelor care se produc la nivelul A.R.N. viral (145).

2.4. ACȚIUNEA FACTORILOR FIZICI, CHIMICI ȘI BIOLOGICI ASUPRA VIRUSULUI A.I.E.

Virusul A.I.E. este considerat ca deosebit de rezistent la acțiunea diversilor factori fizici (236). Radiațiile solare cu o putere calorică de 49°C îl inactivează în 2 ore (4). Încălzit la 58°C el se distruge în 30 de minute (15), iar față de radiațiile U.V. este deosebit de rezistent, chiar de 10 ori mai rezistent decât virusul gripal (202). În coloizii de protecție (sînge uscat) rezistă 7 luni la temperatura laboratorului și chiar pînă la 4 ani dacă este menținut între -10 și -70°C (188). Serul cu virus liofili-zat menține potențialul viral cel puțin 6 luni, iar dacă este tratat cu 0,5% fenol și apoi congelat își păstrează virulența timp de 6—7 luni. La 37°C , virusul A.I.E. se inactivează în 48 de ore (188). O concentrație de 0,4% formol distruge virusul din ser în 30 de zile (276). Pe pășune și în fînul uscat, virusul a fost găsit activ și după 6 luni (188). În fecale și urină el rezistă 2 $\frac{1}{2}$ luni. K r a l (150) susține că virulența urinei este consecutivă prezenței albuminei în concentrație ridicată la caii cu A.I.E. În cadavre și în gunoiul de grajd, virusul supraviețuiește 3—4 luni (4). În solurile nisipoase el își diminuează rezistența; în schimb în pămîntul argilos se conservă foarte bine, fapt care explică focalitatea A.I.E. în unele zone geografice (312). S-a stabilit de asemenea că în apa sterilă de conductă virusul rezistă 158—219 zile dar în apa contaminată el nu supraviețuiește mai mult de 30 zile (249).

Dintre agenții chimici, eterul distruge virusul A.I.E. în 5 minute, chiar dacă acesta este inclus în produse biologice (ser, sînge, organe), provenite de la animale infectate (194). Eterul atacă învelișul viral lipidic pe care îl dizolvă. S-a constatat că un produs biologic (ser, sînge etc.) infectant, tratat cu eter nu mai reproduce infecția în cazul inoculării lui la un animal receptiv. Prin tratarea cu eter a organelor infectate (splină, ficat, ganglion etc.), datorită aceleiași activități antilipidice a eterului, se pune în libertate antigenul aflat în interiorul virionului. Cercetările asupra rezistenței virusului la pH, au stabilit că soluțiile foarte acide ($\text{pH} = 3$) sau foarte alcaline ($\text{pH} = 11$) se dovedesc puternic virulicide (15). Așa se explică acțiunea unor acizi și baze, utilizate ca dezinfectante în practica de combatere a A.I.E. cum ar fi hidroxidul de sodiu, hipocloritul de sodiu, formolul, glutaraldehida, clorhexidina etc. (265).

Produsele biologice ca : bila, apa distilată, sucul gastric și intestinal anulează virulența virusului A.I.E. în 60 minute (144) ; în schimb, enzimele, tripsina, ribonucleaza, dezoxiribonucleaza, nu manifestă nici un efect nociv asupra lui (195).

2.5. CARACTERISTICILE TULPINILOR VIRALE

2.5.1. MODIFICĂRI DE VIRULENȚĂ

Între numeroasele tulpini de virus A.I.E. se constată uneori diferențe mari de virulență (236). După I s h i i (96) majoritatea tulpinilor virale studiate demonstrează o activitate „sui generis”. Astfel, s-a constatat că virulența tulpinilor crește începând de la prima pînă la a 5-a trecere pe ecvine. Începînd însă de la al 6-lea pasaj, această virulență scade, formele evolutive îmbrăcînd un caracter cronic sau latent. Sînt și excepții. Între acestea se înscrie tulpina Wyoming care își menține constant aceeași patogenitate inducînd de fiecare dată, după inocularea „in vivo”, forme acute deosebit de grave (71). De asemenea, scăderea virulenței tulpinilor A.I.E. se poate obține prin treceri pe culturi celulare (144) sau prin tratament cu acizi (acid fenic 0,5%) (264).

2.5.2. PLURALITATE VIRALĂ

Această problemă a putut fi rezolvată abia după ce K o n o (138) a pus la punct testul de neutralizare, cînd s-a stabilit că în populația ecvină circulă diverse tulpini ale virusului A.I.E., care diferă unele de altele prin structura lor intrinsecă. Așa se face că în timpul procesului infecțios, în care virionul suferă unele modificări structurale la suprafața lui se formează noi mutante antigenice cu totul diferite de tulpina primară. S-a constatat astfel că acest fenomen se petrece cu puțin înaintea atacului febril, cînd au loc modificări ale compoziției chimice a glicoproteinei majore aflată la suprafața virionului. Astfel iau naștere mutante sau tulpini noi care sînt transferate apoi altor animale receptive prin intermediul factorilor de transmitere (tabanide, aparatură sau instrumentar medical nesterilizat). La rîndul lor noile tulpini virale astfel pasate suferă pe

animalele infectate noi variante antigenice cu ocazia fiecărui acces febril (103). Aceasta este explicația numeroaselor tulpini de virus A.I.E. existente astăzi în natură.

2.5.3. TULPINI DE REFERINȚĂ

În laboratoarele de virusologie veterinară se folosesc cu predilecție următoarele tulpini de virus A.I.E. :

— New-Hampshire, Texas, New-York și Wyoming, izolate conform denumirilor din diferite focare statale americane, astfel : tulpina New-Hampshire a fost izolată dintr-un focar de A.I.E. în New England în anul 1947, în timp ce congenera sa Wyoming a fost identificată în statul cu același nume în anul 1950 de către *Stein* citat de (198) ;

— tulpina Goshun, utilizată mai ales în Japonia, a fost izolată de *Ishii* citat de (130) dintr-un focar acut ;

— tulpina P-337, descrisă și utilizată, de asemenea în Japonia, se pretează bine la cultivarea pe leucocite de cal (139) ;

— tulpina germană, izolată în R.F.G. este întreținută prin treceri periodice pe cal de către *Fortner* (67). *Nakajima* și *Ushimi* (198) arată că această tulpină este în măsură să declanșeze producția de anticorpi între 2—10 zile după accesul febril. Anticorpul în acest caz formează în reacția de I. D. -Coggins o linie de precipitare cu atât mai clară cu cât produsul serologic se recoltează mai târziu față de momentul infecției ;

— tulpina Alfort, izolată în Franța, este identică imunologic cu tulpina de referință Wyoming. *Toma* și *Goret* (306) au inoculat tulpina Wyoming la ecvine obținând subtulpinile Melanose și Geronimo pe care le-au utilizat în paralel cu tulpinile Alfort, Avril, Alfort-Arlette, Alfort-Retz etc. ;

— tulpina Norma a fost izolată în Cehoslovacia în 1966 dintr-un focar natural (35) ;

— tulpina CQ, izolată în Australia este utilizată acolo la prepararea antigenului necesar pentru testul I. D. -Coggins (296) ;

— tulpinile Harghita, Cometa și Homorod, izolate în România din focare naturale, servesc diferitelor studii în laboratoarele de profil (*Chelmen*, date personale).

Tulpinile de referință își conservă bine virulența timp de 1—2 ani prin păstrare la temperaturi foarte scăzute (-70°C) și treceri periodice pe animale receptive (122).

2.6. PERSISTENȚA VIRALĂ

Persistența virusului A.I.E. pe tot parcursul vieții animalului infectat este un fapt stabilit (103). Dovadă că metodele sensibile (inoculări pe animale receptive, culturi de celule) pun în evidență infecția după ani sau zeci de ani de „liniște clinică” (77).

Cercetările din ultimii 20 de ani au modificat total optica după care virusul A.I.E., prin similitudine cu „slow viruses” (scarpie, encefalopatia vizonilor etc.), nu ar poseda nici o activitate antigenică de stimulare și formare a anticorpilor umorali sau ar manifesta doar o toleranță imunologică ca în cazul coriomeningitei limfocitare sau a leucemiei murine (77). Dimpotrivă, s-a stabilit că în cazul A.I.E. iau naștere între 16 și 42 zile de la infecție anticorpi cu o componentă antivirală multiplă (fixatori de complement, inhibitori ai fixării complementului, precipitanți, neutralizanți etc.), care persistă în organism alături de virus sub formă de complexe imune (138). În componența acestor complexe intră adesea și al treilea element reprezentat de complementul activat sau factorul C₃ (180). Virusul care circulă liber în sânge este în proporție de numai 1%; aproape întreg quantumul viral (99%) este conexat la anticorpi (180). Aceasta a sugerat întrebarea de ce în cantități sporite de anticorpi nu este inactivat întreg conținutul viral. Răspunsul a fost că antigenul viral fiind o componentă internă a virusului nu este accesibil intervenției anticorpilor neutralizanți (307). De altfel, s-a demonstrat experimental că unele antigene, care nu stimulează producția de anticorpi, respectiv care sînt îndreptate împotriva nucleoproteinei interne, sînt absorbite pe suprafața virionului, blocînd astfel capacitatea reactivă a anticorpilor neutralizanți, astfel că aceștia sînt induși în cantități limitate (77).

Dacă în privința prezenței complexelor imune la caii cu A.I.E. lucrurile sînt pe deplin stabilite, este totuși încă neelucidat rolul acestor complexe în persistența virală. În acest sens s-au emis următoarele ipoteze :

a. virusul se poate disocia intracelular de anticorpi, multiplicîndu-se nestingherit un interval scurt de timp (77) ;

b. cînd amestecul de virus-anticorpi neutralizanți atinge anumite limite, în organism are loc o disociere fermentabilă a acestor complexe (268). Într-adevăr, unele virusuri cum este virusul Aleutin al nurelor se reactivează din complexe imune fagocitate, după care se multiplică nestingherit fiind protejat

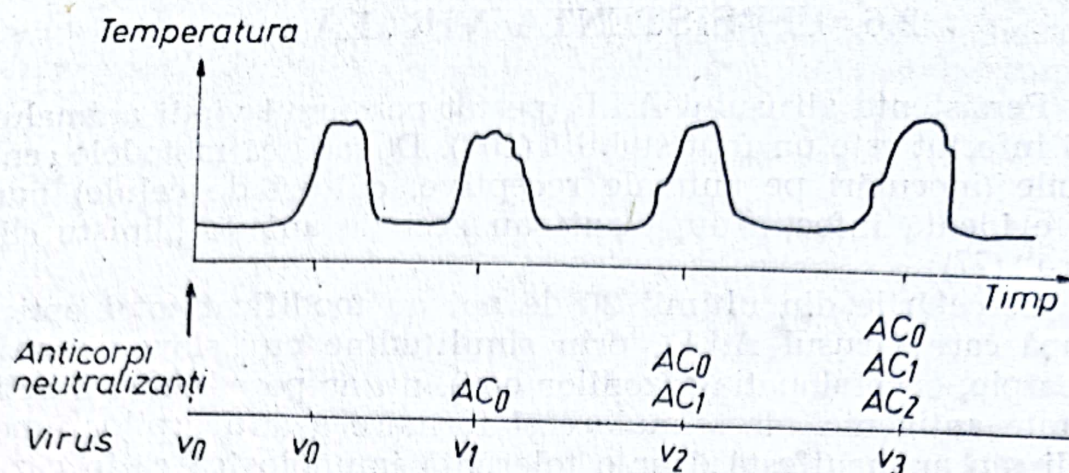


Fig. 3 — Reprezentarea schematică a formării mutantelor antigenice de înveliș în cazul virusului A.I.E. În timpul „O” are loc inocularea calului cu o tulpină de virus ale cărei antigene de înveliș au specificitatea „Vo”. În timpul primului acces febril, virusul deține aceeași specificitate, iar anticorpii neutralizați nu sînt decelabili. Odată cu al doilea acces, în sângele animalului apare un virus cu specificitatea „Vi” și anticorpi „ACo”, capabili să neutralizeze virusul „Vo” inițial. Apoi procesul decurge identic pentru mutantele „V2”, „V3” etc. (după T o m a, 1978)

față de anticorpi (239), comportîndu-se astfel conform primei ipoteze. Aceasta nu corespunde însă virusului A.I.E. pentru care ar fi mai degrabă valabilă cea de a doua ipoteză, întrucît în timpul accesului febril, ca urmare a activării puternice a macrofagelor, are loc o disociere fermentativă și nu o multiplicare virală (77) ;

c. s-a stabilit, de asemenea, că complexele virus-anticorpi- C_3 sînt în măsură să blocheze reacțiile imunitare respectiv imunitatea mediat celular, ceea ce ar permite ca persistența virală să se realizeze indirect pe seama imunosupresiei. De aici, teza lui C o g g i n s (46) că persistența virală nelimitată în organismul animalelor infectate este urmarea firească a absenței răspunsului imun al animalului infectat la agentul viral, anticorpii neutralizanti fiind absenți sau în titruri mici, inoperante ;

d. la fiecare acces febril apar în sânge variante virale antigenic distincte (fig. 3), față de care se formează anticorpi neutralizanti specifici acestor variante (145). Acești anticorpi activează asupra virusului nou circa 30 zile, după care își pierd efectul (312). În acest mod virusul scapă de acțiunea inactivantă a anticorpilor și poate persista în sânge.

2.7. CULTIVAREA VIRUSULUI

Cultivarea virusului A.I.E. este posibilă atât pe animalul viu cât și în culturi celulare.

2.7.1. PE ANIMALUL VIU

După K e m e n y și col. (122) inocularea virusului A.I.E. la animale receptive permite cultivarea lui „in vivo”, dovadă că el reproduce boala după o perioadă de incubatie care diferă de la câteva zile până la câteva luni, în funcție de doza administrată și de virulența tulpinii. Multiplicarea virală are loc inițial în macrofage, limfocite și celule endoteliale (77 ; 178). S-a constatat că virusul apare în sânge cu 2—7 zile înaintea pirexiei (188).

În timpul acceselor pirexice, virusul este identificat în toate organele demonstrând concentrații ridicate mai ales în sânge unde poate atinge 10^6 DIC 50/ml¹, după care o dată cu piroliza scade la valori de la 10^2 — 10^3 DIC 50/ml pentru ca, la cail cu forme înaparente să nu înregistreze decât 10^0 DIC 50/ml (103).

Cultivarea virusului pe animalul viu este practică pentru cel puțin 3 cerințe : a. diagnosticul A.I.E. prin bioprobă ; b. prepararea de antigen tisular necesar testărilor serologice ; c. studiul patogenității tulpinilor virale.

2.7.2. ÎN CULTURI CELULARE

Reușita cultivării virusului A.I.E. „in vitro” a fost inițiată de K o b a y a s h i (128 ; 129) care a reușit primul propagarea lui pe celule de măduvă osoasă și pe leucocite ecvine. Ulterior, K o b a y a s h i și K o n o (130) confirmă valoarea tehnicii prin cultivarea și a altor tulpini de virus A.I.E. pe leucocite de cal.

Ca și agenții altor infecții virale persistente (coriomeningita limfocitară, boala Aleutină, leucemia murină etc.), virusul A.I.E. este relativ necitopatogen pe culturile de leucocite ecvine (46), doar concentrațiile mari de virus induc efectul citopatic (E.C.P.), respectiv atrofierea, degenerarea și desprinderea celulară de pe monostrat fapt care demonstrează infectivitatea acestor culturi și atingerea scopului prin cultivare.

¹ DIC 50/ml = doza infectantă cal 50%/ml.

S-a stabilit că în condiții favorabile de cultivare, leucocitele în concentrație de 2×10^7 însămânțate cu virus A.I.E., cresc aderent pe pereții tuburilor de sticlă, începând din a 2—3 săptămână (130). În caz că inoculul este cantitativ superior, E.C.P. apare la 7 zile sau chiar la 1—2 zile. Lichidul de cultură conține în acest caz 10^{5-6} D.E. 50/ml și poate fi inoculat la animale receptive, declanșând infecția acută sau cronică în funcție de doză (130). Titrul virusului în faza lichidă este mai ridicat decât în stadiul celular, fapt explicabil prin eliminarea rapidă din celule a virusului matur și multiplicat, în urma înmuguririi în interiorul celulei (100). Lichidul cultural conține în acest caz un antigen care poate fi utilizat în R.F.C. pentru diagnosticul A.I.E. (100).

Metoda cultivării virusului A.I.E. pe leucocite de cal nu este totuși ideală atât din cauza dificultăților de selecționare a donatorilor ecvini, contaminați adesea cu herpesvirusuri sau citomegalovirusuri (323). Acestea produc E.C.P. similar cu al virusului A.I.E. (100). De asemenea, metoda prezintă dificultăți în determinarea precisă a punctului final de infecțiozitate celulară (103). La acestea mai trebuie adăugat inconvenientul selecționării serului bovin indemn, care intră inerent în compoziția mediului de cultură celular, în proporție de 50—100%.

Pentru a evita aceste dificultăți, Malmquist și col. (164) ca și Kono (148) folosesc o tehnică în care tulpina de virus A.I.E. este adaptată inițial pe leucocite de cal și apoi cultivată pe o linie celulară dermală ecvină (L.C.D.E.). S-a constatat astfel că, o dată infectată, L.C.D.E. produce virus în continuu fără E.C.P. rămânând astfel persistent infectată în decursul a cel puțin 25 treceri (pasaje) seriale. Virusul astfel cultivat oferă prin tratarea cu eter, cantități sporite de antigen necesar diagnosticului imunologic al A.I.E.

Kono și Yoshino (146) ca și Mathes și col. (171) obțin multiplicarea virusului pe celule renale de fetus ecvin după efectuarea a 50 treceri pe leucocite ecvine. Titrul maxim infecțios atins este de $10^{6,8}$ D.E. 50/0,5 ml¹, pentru infectare fiind necesar doar $10^{2,3}$ D.E. 50/0,5 ml (171). Metoda este deosebit de utilă pentru obținerea de cantități mari de antigen și pentru studiul infecției persistente „in vitro”.

Cultivarea virusului a fost realizată de asemenea cu mult succes pe fibroblaste de cal persistent infectate, care nu induc

¹ D.E. 50/0,5 ml = doză efectivă, corespunzând la TCID₅₀ 50/0,5 ml = doză infectantă a culturii tisulare 50%/0,5 ml (138).

E.C.P. dar care a fost posibilă numai după 3 treceri succesive prealabile pe leucocite de cal. Metoda a permis atât obținerea unui antigen de calitate superioară cât și inițierea unor studii critice ale comportării virusului „in vivo” (51). Din păcate doar puține tulpini de virus A.I.E. au putut fi adaptate la cultivarea pe fibroblaste de cal (146 ; 164) ; tulpinile sălbatice fiind de-a dreptul refractare la astfel de cultivări (100).

A fost încercată de asemenea cu succes propagarea virusului A.I.E. pe o linie celulară KB (cavitate bucală) umană, care a indus un E.C.P. caracteristic (256).

2.8. PROPRIETĂȚI ANTIGENICE.

TIPURI DE ANTIGENE

Antigenul A.I.E. este un subcomponent al virusului (198) sau o particică a unui acid nucleic din el, așa cum s-a observat și în cazul virusului febrei aftoase (45). S-a constatat că antigenul celular rezistă acțiunii eterului, cloroformului și tripsinei, dar nu și tratamentului cu papaină. Căldura de 56°C îl inactivează în 20 minute. De asemenea, el rezistă la +4°C timp de 14 zile, dar la 38°C își diminuează treptat potențialul revelator la 1/2 și apoi la 1/4 etc. (72).

Virusul A.I.E. conține cel puțin 3 antigene sau grupe de antigene (312) : 1 antigen situat în stratul extern al virionului corespunzând antigenului neutralizant și două antigene, aflate în profunzimea masei virionale, reprezentând antigenele de precipitare (imunodifuzie), fixare de complement etc.

2.8.1. ANTIGENE PENTRU REACȚIA

DE NEUTRALIZARE

Antigenul sau grupul de antigene care intervin în reacția de neutralizare sînt presupuse a fi în învelișul viral. Nu au fost încă izolate și caracterizate, dar existența lor acolo este indubitabilă (310). K o n o și col. (145), studiind comportarea acestui antigen în cinetica patogenzei virale, au stabilit că el suferă diverse mutații sau variante, ceea ce se soldează cu apariția în organismul infectat a unor noi tipuri de virus A.I.E. la care organismul se adaptează producînd cu un oarecare decalaj, anticorpi neutralizanți corespunzători noii specificități imunologice.

În afară de cazurile spontane de apariție a acestor mutante antigenice, ele pot fi provocate deliberat prin administrarea unor produse imunosupresoare de tipul dexamethasonei sau cyclophosphamidei, a serului antilimfocitar etc. Aceste produse inoculate provoacă declanșarea crizelor pirexice în cursul cărora se poate izola o tulpină de virus, care posedă o nouă specificitate antigenică de înveliș (148).

Apariția acestor mutante antigenice nu este strict specifică patogeniei virusului A.I.E., la fel petrecându-se lucrurile și în cazul virusurilor febrei aftoase și influenței — varianta umană (64). Atît doar că în cazul acestora, mutantele sau subtipurile antigenice apar la circa 20 zile, în timp ce în cazul A.I.E. prima variantă apare la începutul bolii (după puțin timp de la infecție), pentru ca următoarea să survină la 30 zile și apoi tot mai rar, ajungîndu-se în final ca animalul infectat să se mențină într-o liniște clinică ani sau zeci de ani (46).

2.8.2. ANTIGENE PENTRU REACȚIA DE PRECIPITARE, FIXARE DE COMPLEMENT ȘI IMUNOFLUORESCENȚĂ

Reacția de precipitare, fixare de complement și imunofluorescență se bazează pe un antigen celular prezent în toate tulpinile de virus A.I.E., indiferent de proveniența lor. La rîndul ei, reacția de precipitare sau de imunodifuzie are la bază un antigen brut compus din două fracțiuni, G. și C.

2.8.2.1. ANTIGENUL G

Descris inițial de Coggins și Norcross (44) ca și de Norcross și Coggins (207) antigenul G este denumit astfel întrucît în reacția de imunodifuzie se exprimă printr-o linie de precipitare amplasată mai aproape de godeul cu antigen spre deosebire de antigenul C a cărei linie este situată mai în spre godeul cu ser, respectiv cu anticorpi (fig. 4).

Analizat, antigenul G s-a dovedit a fi o proteină cu greutate moleculară de 27 500 daltoni, avînd o densitate de 1,29 exprimată în clorură de cesiu, un coeficient de sedimentare de 2,4 S (309), un punct izoelectric egal cu 5,8 și un pH de 8,6. El se inactivează în 5 minute la 60°C și nu este influențat de radia-

țiile U.V. (309). Situat în profunzimea virionului, antigenul G este comun tuturor tulpinilor de virus A.I.E. (312), fapt care permite ca, utilizat în reacția I.D.-Coghins să fie în măsură să contribuie la diagnosticul oricărei infecții cu virusul A.I.E.

S-a precizat că în organismul infectat, acest antigen este elaborat mai precoce decât antigenul C și în cantități mai mari decât acesta. T o m a (309) inoculând 25 de cai cu o suspensie virală A.I.E. a reușit să obțină antigenul G de la toți acești cai, dar nu l-a extras decât de la 24 pe cel de al doilea (C).

Antigenul G se prepară, fie prin tratarea suspensiei virale cu eter, fie prin supunerea acestei suspensii la cicluri de congelări-decongelări, fie prin ultrasonare etc. De asemenea, el poate fi obținut, departajându-l de congenerul său C prin precipitarea suspensiei virale cu sulfat de amoniu în concentrație de 22—40% la +4°C și pH 7,4. Antigenul astfel obținut poate fi utilizat curent în testele serologice de imunodifuzie, fixare de complement și imunofluorescență.

2.8.2.2. ANTIGENUL C

Antigenul C a fost identificat de T o m a și col. (309) și este reprezentat de o proteină în greutate moleculară de 20 000 daltoni, avînd o densitate de 1,29 în gradient de clorură de cesiu, un coeficient de sedimentare de 1,7 S și un pH 9. Acest antigen cu un grad de lăbilitate crescut și o masă cantitativ redusă, comparativ cu fracțiunea G, este situat tot în profunzimea virionului, fiind și el comun tuturor tulpinilor de virus A.I.E. (309). Intră obișnuit în reacția de imunodifuzie pentru diagnosticul A.I.E., indiferent de tulpina virală incriminată în procesul infecțios. T o m a (309) a demonstrat că între fracțiunile G și C nu există nici o comunitate antigenică.

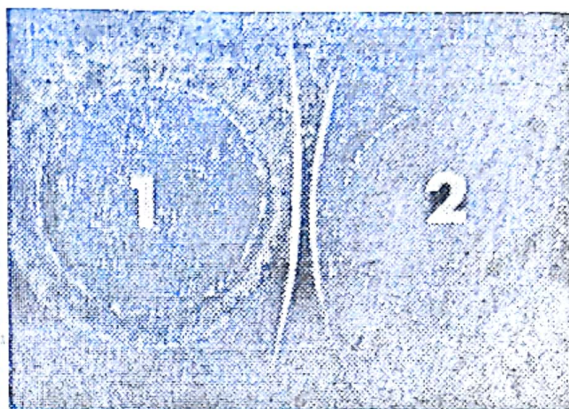


Fig. 4 — Imunodifuzia în geloză a antigenelor G și C, în prezența serului anti-A.I.E. :

1 — extract splenic care conține antigenele G și C; 2 — ser anti-A.I.E. (după T o m a, 1978)

Antigenul C se obține prin supunerea suspensiei virale A.I.E. la tratamentul cu sulfat de amoniu în concentrație de 60—100% respectând parametrii de temperatură și pH, indicați la antigenul G (309).

2.8.2.3. EXTRAGEREA ANTIGENULUI DIN ȚESUTURILE CELULARE

2.8.2.3.1. EXTRAGEREA ANTIGENULUI DIN ȚESUTURI CELULARE CU ÎNCĂRCĂTURĂ ANTIGENICĂ IDEALĂ

Tehnica a fost inițiată de Coggins și Norcross (44) după care a suferit numeroase modificări din partea diversilor autori (25 ; 83 ; 299). Principial, pentru prepararea antigenului se parcurg o serie de etape :

Pregătirea și inocularea tulpinilor de virus. În practică se utilizează tulpini deosebit de virulente din import (Wyoming) sau indigene. Acestea se obțin sub formă de sînge recoltat de la animale aflate în stadiul pirexic primar. Sîngele virulent se poate inocula imediat¹ sau se conservă prin congelare la -70°C și în extremis la -30°C . Doza de inocul este variabilă, incluzînd 50—300 ml sînge integral sau ser defibrinat. Coggins și col. (45) au reprodus infecția acută la ponei inoculînd chiar numai 1 ml ser conținînd 10^6 DIC 50/ml dar ulterior au constatat că obțin rezultate mai bune cu 10 ml sau chiar 300 ml ser virulent. Hawkins și col. (80) arată că au inoculat ponei cu doza de 1—5 ml plasmă virulentă pentru fiecare 45,4 kg greutate corporală. Produsul viral se inoculează obișnuit pe cale i.v. mai rar s.c. sau i.p.

Seleționarea și inocularea animalelor. Cabalinele sau mînjii care urmează a fi inoculați se selecționează dintre animalele în stare de întreținere bună și indemne de boli infecțioase. Aceștia se cazează individual în unități izolate menținîndu-se în observație prealabilă 30 zile², cu termometrie rectală bîdiurnă, control serologic și examen hematologic la începutul, mijlocul și sfîrșitul intervalului. Principial se selecționează un număr mai mare de animale întrucît numai aproximativ 50% din acestea reacționează și produc un antigen corespunzător. Ecvinele odată inoculate, se mențin strict în boxe speciale, perfect închise, la

¹ De aceea este preferabil ca donatorul să fie local, transfuzia fiind astfel operativă (45).

² Coggins și col. (45) recomandă o perioadă de observație de 60 zile.

adăpost de incidența insectelor hematofage, fiind furajate normal și controlate termic bicotidian, examinate clinic și hematologic la fiecare 2—3 zile, iar serologic după 14 zile.

Sacrificarea cabalinelor și prelevarea organelor cu încărcătură antigenică. Cu circa 2—5 minute înainte de sacrificare se injectează i.v. animalului 10 ml adrenalină 1‰ (299) astfel realizându-se o contracție splenică puternică, menită să elimine cât mai mult din sângele rezidual și limitându-se la maximum diluarea antigenului celular (72).

Caii infectați se sacrifică fără anestezie, prin sîngerarea la alb, după 9—11 zile de la inoculare, respectiv cînd animalele au febricitat 3—5 zile peste 40°C (33). Sângele se recoltează direct în vase sterile și se conservă la congelator (—70°C) spre a servi ca tulpină de virus. După deschiderea cavității abdominale se prelevă pe cît posibil aseptice, splina¹ și alte organe întregi (ganglioni limfatici) sau parțiale (ficat, pulmon etc.). Prelevatele organice se introduc în containere sterile sau termose cu gheață.

Tehnica extragerii antigenului celular. În laborator, organele recoltate și decapsulate sînt secționate în bucăți de circa 2×2×2 cm și depuse în vase de sticlă termorezistente care se introduc la congelator (—30 sau —70°C), pentru un interval de 6—8 săptămîni. S-a constatat că valoarea antigenului este cu atît mai ridicată cu cît durată de conservare la aceste temperaturi este mai lungă (72). După intervalul convenit produsele se scot de la congelator și se supun la 10—12 cicluri de decongelare-congelare (72). *C h e l e m e n* (39) a obținut un antigen de bună calitate după 49 de astfel de cicluri. Decongelarea se execută la bain-marie (37°C) timp de 30 de minute, iar congelarea pe parcursul a 20 minute într-un recipient cu amestec semilichid de zăpadă carbonică și alcool de 96°. Conținutul organic, astfel decongelat și recongelat, se triturează într-un omogenizator cu gheață tip „Atomix” timp de 5 minute. Trituratul obținut se centrifughează la 27 000 g, 20 de minute (72). *C h e l e m e n* (40) a obținut un antigen corespunzător după o centrifugare de 60 minute la 7 000 t/m. Supernatantul rezultat din această centrifugare constituie produsul antigenic brut, utilizat în testul I. D. -Coggins.

Antigenul preparat conține în afară de fracțiunile imunologice propriu-zise, extrase din virusul A.I.E. și alte elemente

¹ *C e l e r* (35) a reușit să obțină un antigen corespunzător doar din splină, deși a încercat extragerea lui din diferite organe. *C h e l e m e n* (date nepublicate) a extras antigenul atît din splină cît și din ficat dar nu l-a putut obține din ganglioni și pulmon.

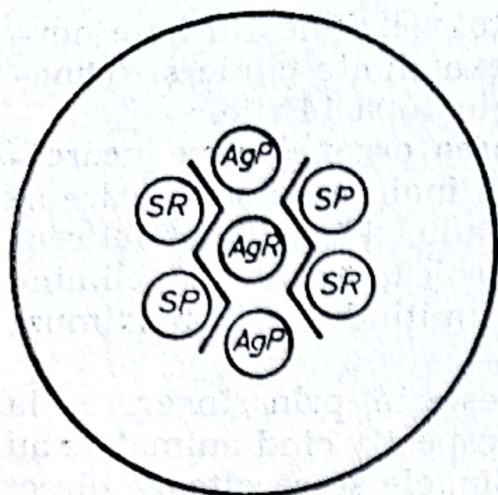


Fig. 5 — Schema de testare încrucișată; se arată concordanța rezultatelor testării obținută cu reactivi indigeni și de referință. AgR — antigen de referință; AgP=antigen propriu (indigen); SR=ser pozitiv de referință; SP=ser pozitiv propriu, indigen

rințe etalon (antigen și ser pozitiv cunoscut).

Cu referire la titrarea antigenului nou preparat, o primă estimare a valorii antigenului se poate realiza utilizând schema de testare încrucișată (fig. 5).

După B o u l a n g e r și A v e r y (26) un antigen corespunzător conține cel puțin 8 unități de lucru. Un astfel de antigen se poate evalua prin diluții binare față de serul pozitiv, respectiv prin titrarea în sistem tablă de șah (tab. 2) practică curent (198; 72).

Cum și această tehnică este puțin precisă, N a k a j i m a și col. (204) recomandă o metodă prin care se poate asigura o titrare mai exactă (ceea ce corespunde cu o activitate mai uniformă a antigenului preparat), respectiv prin reacția de imuno-difuzie radială simplă. În acest scop se folosesc plăci dreptunghiulare din sticlă de dimensiuni 10×8 cm pe care se depune un strat de agaroză 1% și în care este înglobat serul de cercetat, calculat la 1 U ser¹. În stratul de agaroză aplicat pe placă în grosime de 2 mm se realizează godeuri circulare cu $\phi 5$ mm

¹ 1 U ser=diluție de echivalență a serului cu antigenul.

eterogene corespunzătoare organului și speciei ecvine (309), astfel că japonezii N a k a j i m a și U s h i m i (198) preconizează obținerea lui din culturi celulare.

Produsul antigenic poate fi păstrat ca atare la congelator (-30°C) pentru un interval de circa 10—12 luni sau se fiolează și liofilizează în volum de 2 ml (35), ceea ce îl protejează de acțiunea nocivă a unor factori fizici și chimici, timp îndelungat.

Controlul sterilității și titrarea antigenului. În scopul menținerii sterilității și reactivității, fiecare serie de antigen se controlează prin însămînțări pe medii de cultură spre a i se garanta indemnitătea de bacterii, fungi sau alte particule virale (155) și se titrează în funcție de un sistem de refe-

Tabelul 2

Rezultatele titrării antigenului cu serul pozitiv de referință (Intensitatea liniilor de precipitare este apreciată după numărul de (+). Rezultă că în cazul de față antigenul poate fi utilizat în reacție în diluție de 1/2, iar serul 1/5). după Goret și col., 1972

Diluția serului	Pur	Diluțiile antigenului		
		1/2	1/3	1/4
Pur	+++	—	—	—
1/2	+++	+	—	—
1/3	++++	++	+	—
1/4	++++	+++	+	—
1/5	++++	++++	++	—
1/6	+++	+++	++	—
1/8	++	+++	+++	—
1/10	—	++	+++	—
1/12	—	++	++	—
1/15	—	+	++	—
1/20	—	—	+	—
1/30	—	—	—	—

dispuse în linie. Într-un godeu se introduc 35 microlitri de antigen standard, iar în fiecare din godeurile următoare se pipetează aceeași cantitate din antigenele de cercetat. Plăcile cu aceste godeuri se incubează la 37°C pentru 72 ore după care se procedează la citirea rezultatelor. Valoarea antigenului se determină calculând pătratul diametrelor formate de inelele de precipitare perigodeale. Aceste distanțe sînt raportate la ale antigenului standard. Apoi antigenele de cercetat se diluează sau concentrează pînă ce inelele lor de precipitare ajung la diametre egale cu ale antigenului standard (fig. 6).

Estimarea valorică a antigenelor. S-a constatat că valoarea revelatoare a diferitelor antigene este variabilă de la un inter-

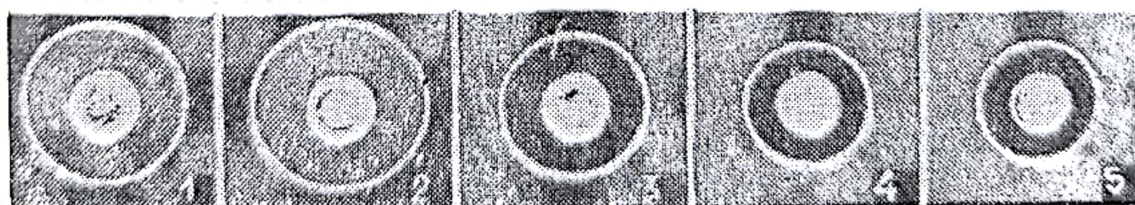


Fig. 6 — Titrarea antigenului prin imunodifuzie radială simplă :

4 — antigen standard ; 1, 2, 3 — concentrații superioare ale antigenului de testat ;
5 — concentrația similară cu a antigenului standard (după Malmquist și col., 1973)

val de timp la altul, motiv pentru care antigenele trebuie titrate periodic.

Diferențe de valoare antigenică s-au semnalat, de asemenea, de la o tulpină virală la alta. Aceste diferențe nu sînt însă semnificative în reacțiile serologice de diagnostic. J i v o i n și col. (111) arată astfel că avînd la dispoziție două antigene, unul de import și altul indigen, au testat 374 de seruri provenite de la cai suspecți de A.I.E., constatînd ca antigenul fabricat de firma Pitman-Moore a depistat 44,26% cazuri pozitive, în timp ce antigenul românesc a evidențiat 40,98% seropozitivi. Prin aplicarea schemei de comparare a celor două frecvențe, autorii constată că diferențele de valoare diagnostică sînt nesemnificative ($t = 0,228$; $p = 0,82$). Z a k o p o l (332) la rîndul lui afirmă că nu a constatat deosebiri esențiale între antigenele obținute cu tulpini virale de import sau indigene.

Pentru departajarea valorică a diferitelor antigene a fost întocmită o scară valorică de etalonare. Astfel, produsul cu cea mai ridicată valoare de diagnostic a fost apreciat la cota 100, limita valorică minimă pentru reacția de imunodifuzie fiind considerată 30 (307). În acest cadru, antigenul Alfort a fost estimat la cota 100, iar cel preparat pe culturi celulare de către M a l m q u i s t și col. (164), considerat ca deosebit de pur, a fost apreciat ca fiind ceva mai activ față de cel preparat din țesuturi și notat cu cota 100+. Toate celelalte antigene realizate de C o g g i n s și N o r c r o s s (44), N a k a j i m a și U s h i m i (198) B o u l a n g e r și col. (25), H a r t și B r o u s s a r d (78) etc., au fost catalogate la cote valorice cuprinse între 100 și 30 (307).

2.8.2.3.2. TEHNICI DE EXTRAGERE A ANTIGENULUI DIN ORGANE SLAB REACTIVE

S-a constatat că nu orice splină provenită de la caii infectați dovedește reactivitate și produce un antigen de calitate. T o m a (309) arată astfel că numai 10 cai din 19 inoculați au furnizat un antigen corespunzător. H e n s o n și col. (83) nu au reușit să obțină un produs antigenic satisfăcător decît de la 2 din 12 cai infectați, deși au utilizat o tulpină virulentă (Wyoming). De aceea, B o u l a n g e r și col. (25) ca și H a r t și B r o u s s a r d (78), preconizează extragerea prin tehnici speciale.

Tehnica Boulanger și col. (1972). În scopul valorificării maxime a organelor slab reactive, Boulanger și col. (25) modifică protocolul pentru obținerea antigenului celular, înlocuind ciclurile de congelare-decongelare prin omogenizarea splinei și extragerea antigenului cu ajutorul acetonei și eterului. Antigenul astfel obținut poate fi utilizat și în RFC (332). În acest scop autorii inițiază o tehnică de extragere pe care o aplică în 2 variante: una pentru produsele cu încărcătură antigenică slabă (extragerea complexă) și alta pentru organele cu reactivitate ideală (extragerea simplificată)¹.

Extragerea complexă: 10 g de pulpă splenică se omogenizează într-un aparat tip Virtis în prezența a 200 ml acetonă răcită. După 2 ore de agitare mecanică într-un refrigerator (+9°C) suspensia este centrifugată la $1\,000 \times g$ timp de 10 minute, iar sedimentul este reluat în același volum de acetonă răcită. Acest procedeu se repetă o dată cu acetonă iar apoi din nou cu un amestec în părți egale de acetonă și eter anhidru. În continuare se lucrează în același mod de două ori dar numai cu eter. După ultima centrifugare, supernatantul este eliminat iar eterul rezidual îndepărtat prin agitare pînă la obținerea unui extract splenic sub formă de pudră. Acesta este reluat în 20 ml ser fiziologic și agitat 12 ore la +9°C. Apoi suspensia este congelată-decongelată de 3—5 ori și agitată din nou la rece (+9°C) alte 12 ore. Urmează o centrifugare la $8\,000 \times g$, menită să elimine resturile tisulare. În final, se obțin 10—15 ml antigen din cele 10 g pulpă splenică. Antigenul astfel obținut poate fi păstrat la congelator sau liofilizat. Pentru utilizarea în fixare de complement se diluează 1/8.

Tehnica Hart și Broussard (1973). Autorii (78) preconizează două tehnici de extragere a antigenului: una pentru organele cu încărcătură antigenică ideală și alta pentru organele pauciantigenice. Aceasta din urmă are la bază extragerea cu ajutorul thiocyanatului.

Tehnica de extragere cu thiocyanat. Pulpă splenică triturată se amestecă în volum egal cu o soluție de 0,8% NaN_3 , după care se depune la rece (+4°C) pentru 1 oră. Se agită manual cîteva minute (2—3') după care conținutul se amestecă cu un volum egal de thiocyanat a cărei molaritate finală trebuie să fie stabilită la 0,5—0,7 M (molaritatea normală a thiocyanatului). Apoi, balonul cu amestec se depune la +25°C pentru 10 minute. Pentru 12 ore conținutul se dializează la +4°C într-un recipient,

¹ Este în esență, extragerea clasică descrisă la pag. 27.

conținând tampon fosfat cu $pH = 7,1$. Suspensia rezultată din dializă este centrifugată la $27\,000 \times g$ pentru 20 minute. Supernatantul se decantează și colectează. Operația de centrifugare, decantare și colectare se repetă astfel de 3 ori supernatantul fiind păstrat de fiecare dată.

Cele 3 supernatante se amestecă într-un recipient apreciindu-se volumul total la care se adaugă o cantitate echivalentă de $SO_4(NH_4)_2$ soluție saturată, cu $pH = 7,1$ (ajustarea se execută cu soluție NaOH). Întregul amestec se agită în prezența bucăților de gheață sau se depune într-o baie de gheață după care se menține o oră la $+4^\circ C$ în scopul precipitării proteinelor. Urmează o centrifugare la $27\,000 \times g$, 15 minute, după care supernatantul se îndepărtează, iar sedimentul se reia într-un volum minim de tampon fosfat cu 0,2 M și $pH = 7,1$. Se dializează 12 ore (peste noapte) în același tampon. Produsul rămas nedizolvat se reia tot într-un volum minim și se centrifughează identic. De data aceasta supernatantul este colectat, el reprezentând antigenul iar sedimentul se elimină. Antigenul este introdus în reacție spre a i se estima valoarea, prin comparație cu produsul de referință, după care se diluează în apă distilată sau se concentrează prin liofilizare și solvare pînă atinge valoarea antigenului etalon.

Această tehnică, deși laborioasă, este totuși cea mai recomandabilă pentru extragerea antigenului din organele slab reactive.

2.8.2.4. TEHNICI DE OBTINERE A ANTIGENULUI DIN CULTURI DE CELULE

Pentru a prepara și standardiza antigenul cît și pentru a obține un produs liber de fracțiuni tisulare exogene, au fost inițiate o serie de metode de cultivare a virusului A.I.E. pe linii celulare. Se utilizează în acest scop extrageri de antigen din culturi de leucocite ecvine, celule dermale sau renale de fetus de cal și recent, fibroblaste, infectate cu virusul A.I.E.

Tehnica Nakajima și Ushimi (1971). Pornind de la lucrările lui Kobayashi și Kono (130), japonezii Nakajima și Ushimi (198) sînt primii care obțin un antigen A.I.E. valoros reprezentat de virusul purificat și concentrat, cultivat pe leucocite de cal. Acest antigen s-a dovedit a fi identic ca valoare de diagnostic cu antigenul preparat de Coggins și Norcross (44) din splină de ponei.

Antigenul preparat de Nakajima și Ushimi pe culturi celulare este în schimb liber de hemolizinele extractelor splenice. El formează în reacție o singură linie de precipitare (165), în timp ce antigenele splenice induc uneori linii suplimentare (30 : 310). Datorită acestor avantaje, prepararea antigenului A.I.E. pe culturi celulare s-a extins, practicându-se astăzi în majoritatea laboratoarelor de profil.

Tehnica preparării antigenului pe culturi celulare include următoarele etape : ultracentrifugare, trecere pe DEAE celuloză și centrifugare în gradient de clorură de cesiu. Suspensia virală concentrată este supusă la cicluri de congelare-decongelare sau la acțiunea eterului pentru 5 minute (309), în urma cărora se eliberează antigenul din virus. Produsul final astfel obținut, se dovedește revelator în reacție când conține un titru echivalent cu 10^8 D.E. 50/0,5 ml (198).

Tehnica Malmquist și col. (1973). Autorii (164) preconizează o tehnică de extragere a antigenului pe o linie dermală ecvină (D.E.), folosind linia celulară ATCC-57. Tehnica prezintă avantajul că este mult mai economică și superioară calitativ, cultivarea celulelor dermale fiind protejată de invazia citomegalovirusurilor și herpesvirusurilor. Totodată tehnica nu pretinde concentrații mari de ser vitelin, care împieteează asupra purificării antigenului. Principiile de bază ale tehnicii sînt :

Linia D.E. este infectată permanent cu o tulpină Wyoming care anterior este trecută de 15 ori pe culturi de leucocite ecvine și de 7 ori pe o linie de celule splenice de fetus de cal. Pe culturile D.E. infectate cu virus A.I.E. nu apare E.C.P. Aceste culturi se dezvoltă bine ca și cele neinfectate, fiind întreținute într-un mediu MEM Eagle care conține 10% ser de vițel fetal, cu tripsinizare săptămînală pentru dedublare (309).

Liniiile de culturi celulare infectate sînt menținute peste noapte la $+4^{\circ}\text{C}$ în prezența polietilenglicolului. Urmează centrifugarea la $1\,000\times g$ timp de 30 minute. Sedimentul este preluat în tampon borat și peste noapte se agită într-un volum egal de eter. Se elimină eterul. Conținutul se centrifughează la $1\,000\times g$ timp de 30 minute, sedimentul se preia în tampon borat ($\text{pH}=8,6$) și se utilizează în reacție ca antigen (309).

Tehnica Kono (1976). Autorul (148) preconizează prepararea antigenului, cultivînd virusul A.I.E. pe linii celulare, renale de cal. Culturile de celule renale sînt subcultivate în prealabil de 2—4 ori, după care se inoculează cu $10^{6,8}$ D.E. 50/0,5 ml tulpină



virală A.I.E. Tulpina, la rîndul ei, este anterior cultivată de 50 ori pe leucocite de cal după care se trece de 13 ori pe o linie celulară renală ecvină. Culturile sînt menținute în mediul MEM-Eagle care conține 10% ser vitelin. Ele sînt subcultivate repetat cu 0,2% tripsină în proporție de 1 : 2 la fiecare 7 zile interval. Antigenele dezvoltate pe aceste culturi se titrează prin testul I.D. și R.F.C. Cele mai mari cantități de antigen se obțin la subculturile 2—4. Avantajul metodei constă în obținerea de antigen de bună calitate și în cantitate superioară comparativ cu alte metode.

3. EPIZOOTOLOGIE

3.1. GENERALITĂȚI

Întocmirea unei statistici exacte a morbidității indusă de A.I.E. în diferite state în care boala se înregistrează sub formă enzootică sau de cazuri sporadice este extrem de dificilă întrucât 1. A.I.E. nu este o maladie cu declarație obligatorie decât în anumite state ; 2. metodologia de diagnostic cu toate avantajele ei are și unele minusuri astfel că un număr de cazuri rămân nedepistate ; 3. politica economico-comercială nu permite să se raporteze situația exactă a cazuisticii A.I.E. ; 4. teama de despăgubiri mari pe care statul este obligat să le achite determină unele renunțări la declararea bolii (188).

Ceea ce se poate preciza din punct de vedere epizootologic — susține M ö h l m a n n (188) — este că A.I.E. fiind o boală cu totul aparte, transmiterea ei este legată de anumiți factori care nu sînt identici peste tot și în tot timpul. Ca urmare, evoluția A.I.E. diferă de la o zonă la alta, de la un caz la altul. K o l e a k o v (132) arată astfel că A.I.E. evoluează cînd epizotic, cînd enzootic, cînd sporadic dar că în genere cazurile sporadice și evoluțiile enzootice constituie majoritatea. Formele acute de boală apar mai cu seamă în unitățile sau localitățile cu focalitate primară, în care boala îmbracă adesea un caracter grav, rata letalității fiind crescută. S-a constatat că adeseori pornind de la unele cazuri sporadice se dezvoltă în 2—4 săptămîni focare enzootice de mare amploare care afectează crescătoriile sau efectivele din zonele învecinate. Obişnuit, după o izbucnire primară cu cazuri mortale în același focar apar forme secundare tot mai puțin grave. Formele cronice și latente sînt dimpotrivă apanajul focarelor vechi de A.I.E.

Se apreciază (53 ; 331) că în urmă cu 30—40 de ani erau mai frecvente infecțiile de contact (prin coabitare) ca urmare a virulenței crescute a tulpinilor circulante ; dimpotrivă, în ultimii 15—20 ani, cazuistica majoră în A.I.E. o formează in-

fecțiile cronice și latente, consecutive diminuării virulenței acestor tulpini.

Animalele infectate, indiferent de forma clinică de exprimare a infecției, sînt purtătoare de virus pentru toată viața, excreția virală în mediul extern fiind mai puternică în cazul formelor acute și mai limitată în stadiul cronic sau latent.

3.2. RECEPTIVITATE

Speciile natural receptivă la infecția cu virusul A.I.E. fac parte exclusiv din genul *Equus*. Nici o altă specie animală domestică sau sălbatică nu s-a dovedit receptivă la infecția naturală cu virusul A.I.E. (147)¹.

Calul deține locul prim în infecția naturală cu virusul A.I.E. Urmează în ordine : asinul, catîrul și bardoul. Mînjii sînt în general mai sensibili decît caii adulți. Ei exprimă de regulă o formă gravă a infecției, jucînd adeseori rolul de revelator al acestei boli față de iepele mame care prezintă frecvent o formă inaparentă (302). Trăpașii (305) în mod special, caii de șa (43), caii de rasă belgiană (4), caii P.S. și 1/2 P.S. (222), ca și cabalinele de tracțiune (232) se dovedesc mai receptivă la infecție, rata lor de morbiditate fiind mult sporită prin comparație cu celelalte categorii de ecvine ; dimpotrivă, caii Criollo din Argentina (88) ca și caii de curse de galop (305) se dovedesc mai rezistenți la infecție. Poneii manifestă o receptivitate variabilă în funcție de rasă. Moore și col. (189) arată astfel că poneii de rasă comună sînt mai rezistenți la infecția experimentală, în timp ce Nusbaum (208) și Kono (138) constată că poneii de rasă Shetland se pretează mai bine la infecția experimentală fiind deosebit de receptivi.

Asinul. Kobayashi și col. (131) descriu A.I.E. la asin arătînd că acest animal este sensibil deopotrivă la infecția naturală și experimentală. În infecția naturală, perioada de incubatie variază în limite mai strînse comparativ cu a calului, fiind cuprinsă între 5—11 zile, pentru ca în infecția experimentală să fie și mai precisă, respectiv 12 zile (71). Cum perioada de incubatie în infecția experimentală a calului este variabilă, Oppermann (217) recomandă asinul pentru inoculările experimentale, Popovici și col. (236) arată că în

¹ Date în legătură cu infecția experimentală la alte specii animale sînt prezentate în subcapitolul (8.5.6.).

Africa au fost descrise adevărate focare enzootice naturale de A.I.E. la asin care însă nu s-au transmis la caii din zonă, dar și transmiterea A.I.E. de la cal la asin constituie o excepție (4).

Catîrul și bardoul sînt afectați deopotrivă și concomitent cu caii aflați în focarele enzootice de A.I.E. Ambele specii îmbracă de regulă o formă cronică sau silențioasă, deși au fost descrise și focare de infecție acută cu mare letalitate în special la catîri (71). Astfel, în vestul Greciei a fost înregistrată în 1971 o enzootie cu forme acute de A.I.E. care a cuprins 80 catîri. Surprinzător este că în cazul catîrilor, diagnosticul de A.I.E. nu a putut fi precizat prin utilizarea testului I. D. -Coggins. Din efectivul total doar 3 animale au fost identificate ca avînd seroreacții pozitive (212). De asemenea, în S.U.A. au fost semnalate enzootii de A.I.E. la catîri cu deosebire în Delta fluviului Mississippi dar care îmbrăcau mai ales o formă cronică (259).

Alte specii animale, domestice sau sălbatice, în total 26, printre care boul, oaia, capra, porcul, cîinele, pisica, iepurele, cobaiul, șobolanul, șoarecele, găina, porumbelul, broasca etc., au fost inoculate experimental cu virusul A.I.E. în cadrul a peste 200 de lucrări publicate fără a se putea reproduce infecția (147).

Omul, în general refractar la infecția naturală, este citat în literatura de specialitate cu 2 cazuri de infecție A.I.E. exprimate clinic.¹

3.3. SURSE DE INFECȚIE

Ca în orice boală infecțioasă și în A.I.E. o primă sursă de infecție o constituie animalul infectat. Mai mult chiar, în A.I.E. un cal infectat rămîne purtător de virus pentru toată viața (77), el constituind astfel o sursă potențială de infecție permanentă pentru congenerii lui. S-a stabilit că ecvinele cu formă clinică acută și în special în faza de preexitus constituie cele mai frecvente surse de infecție. De asemenea, s-a constatat că iepele gestante infectate anterior sau în timpul gestației s-au dovedit nu o dată capabile să transmită infecția descendenților lor atît transplacentar, cît și ulterior prin colostru. Cercetări întreprinse în acest domeniu au demonstrat că transmiterea se realizează în proporție de 1/7 dacă iapa se află în stadiu acut și nu-

¹ Infecția cu virusul A.I.E. la om este descrisă la pag. 157.

mai în raport de 1/9 (mai exact 5 din 45 mînji) dacă se află în stadiul cronic (119).

Sursele de infecție cele mai periculoase și mai delicate sînt constituite de anemolatenți. P e t r o v i ć și col. (232) arată astfel că majoritatea crescătorilor de cai se lasă cu greu convinși că animalele lor sînt infectate și formează surse potențiale de infecție refuzînd sau fiind greu de înduplecat să le elimine din efectiv. K o l e a k o v (132) arată că în U.R.S.S. pînă în jurul anilor 1950 s-a propagat intens ideea că astfel de cai sînt total inofensivi și că este o greșeală ca solipelele anemolatențe să nu fie utilizate în diferitele activități de tracțiune sau călărie. Or, tocmai astfel de cai, cu infecție cronică sau anemolatenți, constituie cel mai adesea sursele de infecție ale diferitelor crescătorii pînă atunci indemne. K e m e n și C o g g i n s (119) afirmă că într-o herghelie în care nu a existat niciodată A.I.E. s-au înregistrat 25 de cazuri după introducerea unei iepe anemolatențe. U m p h e n h o u r și col. (319) la rîndul lor arată că o iapă asimptomatică a contaminat într-o fermă 7 cai în decurs de 3 luni.

Se susține, de asemenea, că secrețiile organice (lapte, spermă etc.), și excretele naturale (fecale, urină), provenite de la animale infectate alcătuiesc adesea surse de infecție (188). Laptele ingerat ca și excretele conținînd virus A.I.E. depuse pe pășuni și furaje, dar mai ales în apă, s-au dovedit, nu o dată, surse de infecție naturală cu A.I.E.

Produsele biologice preparate pe cai anemolatenți au determinat infecții sporadice sau chiar focare enzootice de A.I.E. Un exemplu îl constituie serul antigurmos, preparat pe cai cu infecție cronică, insuficient stocat care a stat la baza declanșării primelor focare de anemie infecțioasă în România (69).

Harnașamentul de tracțiune și contenție provenit de la cabaline cu forme clinice de A.I.E. și cu plăci cutanate sau mucoase a fost incriminat și el ca sursă de infecție pentru animalele cu plăgi deschise (304). De asemenea, așternutul de grajd îmbibat cu sînge ca și ustensilele de hrănit și pansaj utilizate inițial la caii infectați A.I.E. sînt citate în literatura de specialitate printre sursele constante de infecție (188).

Infectele, reprezentate de tampoane, feși, comprese, vată, rămase de la tratarea animalelor infectate cu virusul A.I.E. pot fi incluse de asemenea în categoria surselor de infecție (37).

3.4. CĂI DE TRANSMITERE A VIRUSULUI A.I.E.

A fost demonstrat că infecția virală A.I.E. se transmite ca și leucoza, atât pe cale orizontală, respectiv de la un animal bolnav la altul sănătos, cât și vertical, de la mamă la făt (105). Acest aspect este important mai ales când în cauză sînt animalele cu forme acute de A.I.E. (103).

Căile și mijloacele prin care virusul A.I.E. poate fi transmis de la un animal infectat la altul sănătos au făcut obiectul a numeroase studii (79 ; 188 ; 259 etc.), ale căror rezultate le redăm succint în continuare.

3.4.1. TRANSMITEREA PE CALE TRANSCUTANATĂ

Pielea este considerată principala cale de pătrundere a virusului A.I.E. în organismul animal (17). S-a afirmat că este posibilă transmiterea infecției cu sînge viral depus pe pielea intactă a unui animal receptiv (167), dar verificări ulterioare au infirmat această ipoteză (18). În schimb, prin punționarea repetată a pielii cu ajutorul unui ac contaminat cu sînge virulent, infecția a fost declanșată clinic după 21 zile (277).

De altfel, transmiterea naturală a A.I.E. prin lezarea cuticului în mod natural de către vectori animați (artropode hematofage) sau artificiali (ace de seringă sau instrumente contaminate) constituie cea mai frecventă cale de transmitere a infecției.

3.4.2. TRANSMITEREA PRIN ARTROPODE HEMATOFAGE

Transmiterea naturală a virusului A.I.E. prin insecte hematofage a fost susținută încă de B r i m h a l l și col. (28) ca și de Comisia japoneză de cercetare a A.I.E. (341) ca fiind principala cale de propagare a infecției naturale.

Problema a constituit subiect de cercetare pentru diverși autori (79 ; 121 ; 132 ; 279) care au precizat în final că transmiterea se realizează când insecta hematofagă, hrănită prin ≤ 10 înțepături pe un donator infectat experimental este trecută în-

tr-un interval de 30 minute pe un animal receptiv. Dacă trecerea se efectuează după 4 ore, infecția nu mai are loc (80).

De asemenea, s-a arătat că modul de transmitere al virusului A.I.E. prin artropode hematofage este pur mecanic (120 ; 266), deși s-au publicat date care atestă că virusul A.I.E. se multiplică și în culturi de celule ovariene provenind de la țânțarul *Culex pipiens quinquefasciatus* (27).

Dintre insectele hematofage incriminate în transmiterea infecției cu virusul A.I.E., musca de cal și căprior (*Tabanus fuscicostatus hine*) deține locul prim. I s s e l și C o g g i n s (103) arată astfel că această infecție este posibilă întrucât: a. musca provoacă înțepături dureroase animalului, hrănirea ei fiind astfel întreruptă de mișcările pielii, lovirile cu botul, picioarele și coada calului, astfel că insecta este obligată să-și întrerupă hrănirea și să revină sau să se deplaseze¹ pe un alt animal pe care să-și continue prânzul; b. armătura bucală a insectei permite transportul mecanic al unei mari cantități de sînge virulent.

Alte artropode hematofage, considerate a fi agenții vectori ai virusului A.I.E. sînt musca de grajd (*Stomoxys calcitrans*) și țânțarul (*Psorophora columbiae*). D i m i t r o v și col. (53) susțin că în Bulgaria vectorul principal al transmiterii infecției A.I.E. îl reprezintă căpușele. A fost de asemenea semnalat un caz rar de transmitere a infecției virale A.I.E. prin lipitoarea *L. nilotica* (99). Totodată s-a precizat că gastrofilii gastroduodenali și păduchii cailor infectați nu sînt în măsură să reproducă infecția A.I.E. întrucît trituratele lor inoculate la cabaline receptive au indus rezultate negative (4 ; 99); în schimb, strongilii² intestinali supuși aceluiași operații de triturare și inoculare au reprodus infecția clinică tipică (218). Acest fapt este explicabil dacă se iau în considerare microleziunile intestinale urmate de hemoragii punctiforme care se constată la animalele parazitare.

Incriminarea insectelor hematofage în transmiterea virusului A.I.E. are la bază situația epizootologică a focarelor A.I.E. din zonele tropicale, ca și din Japonia, America de Nord, R.F.G. etc., unde incidența bolii atinge valori ridicate mergînd uneori pînă la 30%, mai ales în condițiile în care cabalinele pasc în majoritatea timpului pe cîmpii riverane (48 ; 188). În celelalte zone

¹ H a w k i n s și col. (80) au stabilit că o muscă parcurge zilnic în itinerarul său de hrănire de la un animal la altul o distanță de minimum 4 mile ($4 \times 1,6 \text{ km} = 6,4 \text{ km}$).

² Dimpotrivă, ouăle de strongili nu conțin virus A.I.E. (218).

geografice circulația artropodelor hematofage în sezonul estival și în mod deosebit în lunile mai și august explică de ce primele cazuri de A.I.E. apar în lunile iunie iar apoi cele mai grave în lunile septembrie și mai ales octombrie (261). Tot astfel se explică de ce caii adăpostiți în grajduri întunecoase, în boxe vecine cu cei bolnavi de A.I.E., sau menținuți în comun într-o încăpăre cu aceștia timp îndelungat (5—14 luni), nu se contaminează deși se hrănesc și adapă din aceleași surse (278). La fel s-a stabilit că în Elveția unde caii pasc în comun pe platouri situate la 800 m altitudine ca și în zonele tropicale cu înălțimi de circa 2 500 m, în care vectorii naturali ai virusului A.I.E. sînt absenți, boala este necunoscută. Dacă incidența crescută a A.I.E. este un fapt notoriu în zonele tropicale — unde aceasta poate atinge cote prevalențiale de 20—30% (58) — tot în astfel de regiuni sînt consemnate și situații paradoxale. Una din acestea o reprezintă statele africane Senegal și Maroc, cunoscute prin incidența sporită a insectelor hematofage și în care prevalența A.I.E. se situează la cote minime, respectiv sub 1% (154) : din 280 de seruri ecvine recoltate de la o fermă din Meknes (Maroc) numai un ser a fost găsit pozitiv la testul I.D.-Coggins, iar din 749 probe recoltate de la caii sacrificați în abatorul din Casablanca, doar două reacții au fost catalogate ca pozitive (191).

În general se apreciază că transmiterea infecției în condiții naturale este totuși un fenomen supus multor variabile (103). Între acestea, forma de exprimare clinică a bolii în care concentrația de virus în sângele animalului se situează la cote de 10^6 DIC 50/ml, explică de ce astfel de animale transmit infecția mai frecvent decît anemolatentele a căror valori nu ating decît 10^0 DIC 50/ml (102).

După Issel (102) transmiterea infecției de la purtătorul inaparent la receptor se realizează în proporție de $1 : 3 \times 10^5$, sau chiar $1 : 3 \times 10^6$, în timp ce de la animalele infectate acut aceasta are loc în proporție de 3 : 1, respectiv 3 cai receptivi se pot contamina de la 1 cal infectat. Și totuși transmiterea infecției a fost posibilă și în condițiile cînd musca s-a hrănit inițial pe un purtător inaparent, afebril de cel puțin 30 zile înainte de această hrănire și care a rămas afebril încă 87 zile după aceea (121). Așa se explică de altfel de ce infecția naturală se transmite de la caii afebrili la cei indemni în mod intempestiv (155).

Pe linia aceluiași variabile se înscrie și faptul că în focare explozive nu toți caii receptivi se infectează, ceea ce demonstrează că transmiterea prin artropode constituie și o problemă

de șansă. Exemplul îl constituie iepele cu mînji care pasc vara împreună în preajma unor cai infectați latent îmbolnăvinduse fie iepele-mame, mînjii rămînînd indemni, fie invers (120).

3.4.3. TRANSMITEREA IATROGENĂ

A doua cale majoră de transmitere a infecției cu virusul A.I.E. o constituie contaminarea accidentală pe cale iatrogenă. Astfel, virusul poate fi transmis prin ace hipodermice (305), sonde nazo-esofagiene, pense de castrat, termometre etc., utilizate inițial la animale infectate și apoi transferate la animale indemne, fără decontaminarea prealabilă (333). În acest sens, P e a r s o n (223) demonstrează că virusul care poate fi preluat pe acul de seringă cu ocazia înțepăturii accidentale a unui cal infectat este echivalent cu conținutul viral al unei doze de 10^{-6} dintr-un ml de ser, prelevat de la un purtător viral inaparent. Or, se știe că aceasta constituie doza infectantă minimă pentru infectarea experimentală a unui animal receptiv (122 ; 130). De aceea, practicile inoculărilor sezoniere (vaccinări, maleinări) sau curative efectuate fără respectarea riguroasă a asepsiei și antisepsiei sînt susceptibile de a transmite infecția în serie (216). M ö h l m a n n (188) consideră că numărul de cazuri de A.I.E. induse prin seringi la caii de curse din S.U.A. depășește pe cel al insectelor hematofage. K a r g e r și S c h m i d t (116) au reușit astfel să transmită infecția A.I.E. în lanț la 145 mînji cu o sondă nazo-esofagiană contaminată în timpul unei operații de dehelmintizare profilactică. K r a l j și col. (151) au contaminat, de asemenea, cu virusul A.I.E. toți armăsarii caștrați într-o zi cu o pensă nesterilizată după operarea primului animal anemolatent.

3.4.4. TRANSMITEREA PE CALE TRANSPLACENTARĂ

A fost demonstrat faptul că virusul A.I.E. poate traversa bariera placentară infectînd fătul (95 ; 279). Iepele gestante cu forme acute de A.I.E. prezintă șanse sporite să procreeze mînji infectați. K e m e n și C o g g i n s (119) arată astfel că din 7 iepe cu semne clinice de A.I.E. a rezultat 1 mînz infectat (1 din 7) în timp ce din 45 iepe infectate subclinic doar 5 mînji s-au dovedit a fi contaminați (1 din 9). Rezultă că transmiterea verticală

(transplacentară) este puțin frecventă (223). Răspunsul fetal la infecția transplacentară se exprimă variabil : 1. fetoșii infectați pot fi avortați ; 2. născuți vii fie prematuri, fie la termen ca virus pozitivi, respectiv cu infecție clinică sau anemolatentă (103) ; unii din aceștia sucombă după câteva zile de la naștere (216) ; alții prezintă aspect normal, dar se dezvoltă dificil, obosesc repede, febricitază adesea, motiv pentru care sînt vînduți repede (24).

3.4.5. TRANSMITEREA PRIN MUCOASA GENITALĂ

Prezența virusului A.I.E. în sperma armăsarilor infectați a fost dovedită (94), iar inocularea s.c.a. acestui produs a declanșat infecția (279). Contaminarea prin montă este posibilă mai ales în cazurile de orhită A.I.E. și dacă mucoasa genitală a femelei este lezionată (65). L e p h e r d (155) citează cazul unui armăsar infectat inaparent care a contaminat în serie toate iepele dintr-o zonă nordică a Australiei. M c C a r r o l (174) precizează și el că atît armăsarii cu forme clinice cît și anemolatenții sînt în măsură să transmită infecția. Z a k o p o l (332) la rîndul lui arată că din cupluri infectate au rezultat fie mînji indemni fie descendenți infectați, forma de boală fiind exprimată imediat după naștere, alteori la câteva luni.

3.4.6. TRANSMITEREA PRIN CONTACT (COHABITARE)

Infecția prin contact, afirmă M ö h l m a n n (188) este calea prin care virusul A.I.E. ajunge în organismul animal în care se fixează, fără intervenția gazdelor intermediare vii sau a instrumentarului contaminat.

În practică, transmiterea virusului A.I.E. pe cale orizontală, respectiv prin cohabitare, se realizează neregulat (223), aceasta fiind mai degrabă excepție de la regulă. O astfel de transmitere este totuși posibilă în caz de prelungire a contactului strîns cu un animal aflat în plină evoluție acută (174), sau în stadiul final al bolii, în condițiile în care hrănirea și adăparea se realizează din surse comune de către un personal unic (259).

Böhm și col. (24) citează chiar un caz de transmitere a A.I.E. de la un cal infectat subclinic la altul indemn, ambii cazați în același grajd, în boxe învecinate.

3.4.7. TRANSMITEREA PE CALE DIGESTIVĂ

Această cale a fost incriminată cu deosebire în cazurile când caii se aflau la pășune unde iarba sau apa erau contaminate (65). De asemenea, autorii francezi și germani au semnalat-o ca avînd loc cu deosebire în timpul iernii la caii aflați în stabulație, cînd erau hrăniți și adăpați cu produse contaminate (99). Experimental s-a demonstrat că astfel de transmiteri sînt posibile cu condiția să existe leziuni pe mucoasa tubului digestiv și să se administreze cantități mari de virus (4 ; 99). De aceea, Stein și Mott (279) susțin că infecția pe această cale este inconstantă, iar Möhlmann (188) precizează că alimentele (furajele, colostrul) deși conțin virusul A.I.E. pot să nu inducă întotdeauna infecția ca urmare a intervenției HCl din sucul gastric care inactivează virusul A.I.E. Rezultă că această cale de transmitere nu este certă dar nici exclusă. De altfel, Kemen și Coggins (119) ca și Umphenhour (319) constată A.I.E. la mînji după hrănirea acestora cu colostru contaminat (la naștere, mînji erau seronegativi). S-a stabilit de asemenea că lichidele — laptele și apa — care nu rămîn în stomacul animalelor decît un timp limitat, trecînd repede în intestin (într-un mediu ușor alcalin), dețin cele mai mari șanse de contaminare, în timp ce furajele groiere care sînt în mod normal atacate de sucul gastric devin rareori infectante. Infectarea are loc în astfel de cazuri în condiții de hipoaciditate gastrică (188).

3.4.8. TRANSMITEREA PE CALE RESPIRATORIE ȘI OFTALMICĂ

Calea respiratorie, incriminată de unii autori în transmiterea virusului A.I.E., nu a fost confirmată de experiențe ulterioare ; în schimb, transmiterea oftalmică s-a adevărit chiar în condițiile unor doze infime de virus inoculate în camera anterioară a ochiului (99). Radenikovski (241) susține că a reprodus astfel infecția cu numai două picături de ser infectat, iar Möhlmann (188) a obținut aceleași rezultate cu secreție lacrimală și nazală, recoltată de la caii aflați în plin acces febril.

3.5. FACTORI EPIZOOTOLOGICI

Incidența A.I.E. în diferite efective poate fi influențată de factorii epizootologici care la rândul lor depind de individ sau de colectivitate, de mișcările de efective ca și de condițiile pedoclimatice și de stress.

3.5.1. FACTORI DEPINZÎND DE INDIVID

A fost stabilit că *vîrsta* animalului nu influențează decît în mică măsură incidența A.I.E., caii de 11 ani, ca și cei de 3—4 ani contaminîndu-se în aceeași măsură. Mînjii exprimă totuși boala clinică mai repede și mai frecvent decît caii adulți. *Sexul*, de asemenea, nu prezintă particularități în contaminare, dovadă că într-un focar, infecția A.I.E. este proporțional egală între masculi și femele. *Locul* de staționare în adăpost față de animalul bolnav prezintă în schimb o deosebită importanță, caii din padocurile sau boxele învecinate fiind mai expuși la infecție decît congenerii lor situați la distanțe mai mari (71). *Forma de boală* prezintă, de asemenea, importanță, caii cu formă clinică acută difuzînd mai repede infecția decît caii cu formă cronică sau latentă.

3.5.2. FACTORI DEPINZÎND DE COLECTIVITATE

Mișcările fortuite ale efectivelor hipo în timpul conflictelor armate interstatale (ex. cele două războaie mondiale), ca și participarea echipelor de călărie la diferite concursuri sportive din țară și străinătate, precum și detașarea armăsarilor de montă publică în diferite localități, a dus uneori la contaminarea acestora cu virusul A.I.E. Möhlmann (188) arată astfel că în Germania demobilizarea anarhică la finele celui de al doilea război mondial, a constituit un prilej de contaminare a unităților teritorializate, indemne pînă atunci de A.I.E. De asemenea, preluarea cailor de captură de către japonezi după războiul din 1904 a sporit considerabil rata prevalenței A.I.E. în șeptelul ecvin nipon. Participarea cabalinelor din zonele de est ale Franței — cunoscute ca enzootice în A.I.E. — la diverse concursuri hipice în localități situate în centrul Franței a contribuit la difuzarea infecției în aceste arii geografice (301).

Completarea efectivelor cu armăsari de reproducție sau cu cai de performanță, procurați din zone incerte sub raport A.I.E. sau importați fără control serologic prealabil, a constituit adesea cauza izbucnirii unor focare enzootice. Ishii (96) arată astfel că primele cazuri de A.I.E. au apărut în Japonia în anul 1889 după importul unor cai de valoare din California. Codazza (43) afirmă că importul de cai din Iugoslavia a dus la contaminarea a două manejuri în Italia de unde apoi boala s-a extins. Burki și col. (30) susțin că A.I.E. s-a declarat în Austria, numai după ce între anii 1976—1977 s-au importat cai 1/2 P.S. din Polonia.

Schimburile frecvente de cai între diferitele asociații sportive, așa cum se practică în ultimii ani în R.F.G., între cluburile de călărie și școlile de echitație, care înlocuiesc acum creșterea individuală a calului practică odinioară la orașe (24) contribuie, de asemenea, la difuzarea infecției. Menținerea în custodie a iepelor de reproducție în diferite ferme din S.U.A., spre a avea asigurată monta cu armăsari de valoare, au ocazionat, de asemenea, declanșarea unor focare de A.I.E. (319).

3.5.3. FACTORI PEDO-CLIMATICI ȘI DE STRESS

Factori pedologici. Observații vechi (246) arată că A.I.E. apare și se extinde în zonele cu așa-numitele „soluri incomplete”. S-a constatat astfel că unele terenuri pe care pășteau animalele sau erau utilizate pentru cultivarea plantelor furajere, se dovedeau deficitare în oligoelemente ca N, K, Na, Ca, Ph, Cl, I etc., și conțineau un pH acid, precum și un grad ridicat de umiditate. Or, este cunoscut că astfel de soluri sînt caracteristice zonelor anemogene de silvostepă sau stepă în care A.I.E. se înregistrează cu o prevalență marcantă. Dacă la aceasta, arată Jivoin și col. (109) se mai adaugă o exploatare neratională, respectiv hrănirea cu rații de furaje insuficiente și deficitare sub raportul conținutului în substanțe proteice minerale și vitaminizante, riscul de grefare a infecției pe un astfel de fond organic este considerabil sporit. Dovadă că animalele cu forme clinice de A.I.E., transferate în zone cu „soluri complete” își amendează simptomele, respectiv „se vindecă”. Exemple de soluri deficitare sînt în zonele geografice de altitudine mică și umede sau împădurite din S.U.A. care conțin o rată de prevalență a A.I.E. de 20—30% (58 ; 259), ca și regiunile întinse de silvostepă și stepă din U.R.S.S. (132 ; 236). Böhm (21) arată de

asemenea că în R.F.G. boala apare și se extinde mai ales în anumite areale fiind legată parcă de unele soluri. Altara (4) precizează că excesul de mangan din anumite terenuri favorizează apariția A.I.E. Masoero (170) recomandă chiar o rețetă terapeutică pentru cazurile clinice de A.I.E. în care include o serie de produse minerale (deficitare în zonele indigene) administrate zilnic în rația animalelor bolnave. Tratatamentul durează 20 de zile, este urmat de o pauză de 30 de zile și se repetă apoi dacă este cazul. Rețeta cuprinde pro die și pe animal : lactat de calciu 10 g, fosfat de potasiu 9 g, fosfat de calciu 5,5 g, fosfat de sodiu 3,5 g, sulfat de magneziu 2,5 g, clorură de sodiu anhidră 1,75 g, lactat de fier 0,5 g, acetat neutru de cupru 0,18 g, protoiodură de fier 0,10 g, lactat de zinc 0,02 g, sulfat de cobalt 0,02 g și anhidridă arsenioasă 0,01 g.

Factorii climatici influențează la rîndul lor într-o măsură și mai mare incidența A.I.E. Căldurile excesive din sezonul estival și cu deosebire zilele călduroase care succed unora cu ploi torențiale reci, favorizează zborul intens al insectelor hematofage (tabanidelor). Acestea găsesc ca surse de hrănire cu sînge corpul cailor care pasc pe luncile din apropierea pădurilor sau lacurilor. De aceea, se apreciază că 50% din cazuistica A.I.E. are loc vara și la începutul toamnei (263). Temperatura scăzută de pe înălțimile munților nu este favorabilă circulației insectelor hematofage astfel că ecvinele care pasc în zonele montane sînt puțin expuse riscului de contaminare (297). Möhlmann și Schmidt (187) susțin că recrudescența sezonieră a A.I.E. în zonele cu climat temperat este consecința a doi factori : 1. insectele hematofage ; 2. debilitarea fiziologică a animalelor în sezonul estival. Aceasta din urmă a fost demonstrată de autori care au inoculat cu aceeași doză o serie de animale receptive începînd din luna ianuarie pînă în iunie. S-a constatat astfel că timpul de supraviețuire al cailor infectați, scade treptat din ianuarie pînă în iunie, ceea ce echivalează cu o debilitare organică progresivă în acest interval (tabelul 3).

Rezultă că cei doi factori se adîionează sau potențează reciproc, astfel explicîndu-se de ce în lunile călduroase începînd din mai pînă în octombrie, incidența A.I.E. este mereu în creștere (188).

Factorii de stress, fie că sînt de ordin fizic, chimic sau biologic intervin dereglînd echilibrul care se instalează între virus și organism, în cazul formelor latente de A.I.E. (71).

Factorii fizici reprezentați de călduri excesive sau de geruri aspre, precum și de eforturi prelungite, la care sînt supuse une-

Tabelul 3

Intervalul de supraviețuire în A.I.E. raportat la lunile de infectare

Lunile de infectare	Număr de cai infectați	Durata de supraviețuire
ianuarie	11	7,7 luni
februarie	3	6,4 luni
martie	5	5,4 luni
aprilie	6	4,6 luni
mai	6	2,0 luni
iunie	6	1,3 luni

ori cabalinele anemolatente, au constituit adesea indici favorabili pentru grefarea virusului A.I.E. pe organisme debilitate sau au dus la acutizarea procesului latent. Acțiunea *factorilor chimici* a fost demonstrată de N u s b a u m (209) prin administrarea diferitelor doze de corticosteroizi ca și de K o n o (148) prin inocularea parenterală a unor produse imunosupresoare ca dexametazona sau cyclophosphamida sau de M ö h l m a n n (188) prin anestezia cu cloral hidrat. Dimpotrivă, inoculările cabalinelor cu atropină și adrenalină, conjugate cu supunerea acestora la supraeforturi prelungite nu a provocat acutizarea formelor latente, ci a declanșat doar un sindrom digestiv (indigestie acută) (331). Factorii biologici, respectiv serul antilinfocitar (71), ca și antigenul rujetic sau tetanic (69) au reprodus accesele pirexice la animalele cu forme subclinice de A.I.E. La fel, impactul, surmenajul, bolile infecțioase intercurrente, gestația avansată, tulburările endocrine ca și sîngerările masive ocazionate de intervențiile chirurgicale mari (46) s-au dovedit uneori imunosupresoare declanșînd procesul infecțios acut de A.I.E.

4. PATOGENEZA

4.1. GENERALITĂȚI

Lucrările de cercetare privind patogeniza A.I.E. au arătat că virusul A.I.E. deține o capacitate limitată în a forma leziuni celulare (253), că el posedă o hemaglutinină (265) care se fixează pe eritrocitele de cobai și că imunoglobulinele specifice se corelează cu proteinele virale (103). Complementul este astfel atras de complexe imune care sînt amplasate pe suprafața hematiilor. S-a demonstrat așadar că globulele roșii, cu complementul fixat pe suprafața lor, circulă în sângele periferic al cailor cu A.I.E. (227) și că eritrocitele pot fi fagocitate de leucocite (175).

Multiplicarea virusului și difuzarea lui în organism a putut fi urmărită prin determinări de infecțiozitate pe animale receptivă și prin investigații cu ajutorul imunofluorescenței și microscopiei electronice (77). S-a probat astfel că la fel ca în explantele celulare, infecția naturală este urmarea pătrunderii virusului în monocitele sanguine, respectiv în macrofagele sistemului celular reticular din splină, celulele lui Kupffer din ficat, limfocitele mari din ganglioni etc. În interiorul acestor celule, virusul A.I.E. dispune de condiții ideale de cultivare și multiplicare fiind bine protejat de acțiunea anticorpilor neutralizanti (253).

4.2. CINETICA INFECȚIEI

După Dreguss și Lombard (57), procesul infecțios în A.I.E. începe și se desfășoară astfel: între 2—6 zile de la incidența virală cu organismul apare o primă reacție termică benignă, reprezentînd primul indiciu de infecție. Această reacție nu este de regulă sesizată. După alte 8—9 zile survine accesul febril marcat care reprezintă de fapt o reacție alergică, respec-

tiv sindromul febril major care răspunde astfel primului acces febril benign.

La rîndul lui K o n o (138) arată că viremia apare între 2—7 zile înaintea primei pirexii, concentrația virală crescînd apoi rapid pînă ce atinge apogeul febril. Treptat, viremia scade o dată cu piroliza pînă la stadiul nedetectabil pentru ca să crească din nou în titru în timpul fiecărui acces febril, în pofida prezenței anticorpilor neutralizanți (99). De aceea, concentrațiile virusului diferă, fiind maxime în timpul accesului febril și scăzînd evident în faza de remisie (48). De asemenea, aceste concentrații sînt mai ridicate în formele acute și mai reduse în formele cronice și latente. Astfel, în forma acută cu febră de $\geq 39^{\circ}\text{C}$ valorile concentrației virale sînt de ordinul a 10^6 DIC 50/ml, în timp ce în forma cronică (faza de remisie) aceste concentrații se situează la valori de 10^3 DIC 50/ml pentru ca în stadiul latent nivelul virusului să coboare la 10^0 DIC 50/ml (103).

Multiplicarea virală în macrofagele din sînge și organe este urmarea elaborării proteinelor virusului A.I.E. în celulele infectate (178). Atunci are loc stimularea răspunsului celular T și B (44), respectiv apariția anticorpilor umorali și celulari. Aceștia sînt decelabili prin teste serologice (I.D., R.F.C., inhibarea H.A. etc.), între 14—45 zile de la infecție (138). Apreciind rata mare de multiplicare a virusului A.I.E. în măduva osoasă, I s h i i (93) consideră că declanșarea procesului infecțios în acest organ și apoi persistența lui în sînge formează cheia înțelegerii cineticii virale în această infecție. Ca urmare a producției persistente de virus A.I.E. la acest nivel, stimulul imun celular este continuu (103). Dovadă este hiperplazia limfoidă și hipergamaglobulinemia permanentă la caii cu infecție cronică (83 ; 103).

4.3. DISTRIBUȚIA VIRUSULUI ÎN ȚESUTURI

Într-un studiu experimental, K o n o și col. (142) constată că virusul A.I.E. se distribuie în organism în raport direct cu evoluția procesului infecțios. Există chiar un paralelism între creșterea virusului în sînge și organe, exceptînd perioada de incubare și primul acces febril cînd nivelul virusului este mai ridicat în ficat (celulele Kupffer) decît în sînge, indicînd astfel prioritatea procesului infecțios A.I.E. în acest organ.

În mod firesc, la caii infectați și sacrificați înainte de apariția viremiei agentul patogen nu este detectat în nici un organ ; în schimb, imediat după ce virusul apare în sânge el se găsește atât în ficat cât și în serul sangvin. Odată consumat primul simptom febril, virusul este detectat atât în ficat și ser cât și în splină titrurile sale variind între $10^{4,5}$ — $10^{5,0}$ D.E. 50/0,5 ml ; după 4—8 zile de febră el se decelează în ficat, ser, splină, pulmoni, rinichi, ganglioni, tonsile și măduva osoasă, la nivele mai ridicate ($10^{5,0}$ — $10^{5,5}$) sau mai scăzute ($10^{4,25}$ — $10^{5,0}$ D.E. 50/0,5 ml) (142).

Mc G u i r e și col. (178), folosind tehnica imunofluorescenței directe, reușește să stabilească localizarea virusului în diferite organe în funcție de formele clinice de A.I.E. astfel :

— în forma acută, virusul a fost detectat în sânge (cu pre-dilecție în macrofage), splină (pulpa roșie și mai puțin în zona albă), în ficat (celulele lui Kupffer), în ganglionii limfatici, splenici, hepatici, renali (zona medulară și în sinusul subcapsular), rinichi (glomeruli) ;

— în forma cronică afebrilă, prezența virusului a fost semnalată în primul rând în măduva osoasă — considerată organul de elecție al propagării virale (100) — apoi în ser, ficat, splină, rinichi și ganglioni limfatici, denotînd astfel strînsa corelare dintre multiplicarea virală și aceste organe. Virusul a fost detectat totodată în lapte și spermă (223), lacrimi, jetaj și secreția bronșică (236).

4.4. MECANISMUL PATOGENEZEI VIRALE

Mecanismul patogenezei virusului A.I.E. este departe de a fi elucidat. Se știe doar că acest virus manifestă o persistență permanentă în organism, iar replicarea lui periodică se derulează în sânge sub influența diferiților factori stresanți exo-endogeni ; că o dată titrul viral ajuns la maximum se induc accesele febrile (remitente sau intermitente) după care nivelul virusului scade pînă la limita minimă. El nu dispăre din sânge, menținîndu-se în stare latentă atât în patul vascular cât și în măduva osoasă, splină și ficat. De îndată ce rezistența organică scade, ca urmare a intervenției factorilor de stress, virusul se reactivează (replică) inducînd întregul cortegiu simptomatic (238), inclusiv leziunile sistemice. Mecanismul intim al pato-

genezei virale, urmare căreia are loc instalarea leziunilor tisulare se explică deocamdată prin următoarele ipoteze :

a. virusul avînd un caracter hemotrop acţionează în mod deosebit asupra masei eritrocitare pe care o lizează în proporţii variabile astfel realizîndu-se sindromul anemic preponderent faţă de celelalte considerate secundare (238) ;

b. virusul incită electiv S.R.E. şi elementele mezenchimale pe care le scoate din funcţie, anemia fiind secundară, respectiv consecutivă lezării organelor hematogene ;

c. virusul se propagă multilateral incluzînd organele şi principalele funcţii vitale cu deosebire sistemul neuro-vegetativ, ganglionar şi endocrin, de unde rezultă perturbaţiile trofice umorale şi tisulare ale căror consecinţe sînt leziuni ale sistemului cardiovascular, renal etc.

Prima ipoteză (a) susţine că virusul A.I.E. dispune de o hemaglutinină caldă, respectiv o imunoglobulină M. Aceasta este produsă, treptat, de fracţiunea C_3 care este responsabilă de creşterea fragilităţii eritrocitare şi de scăderea rezistenţei hematiilor (factorul C_3 este fixat pe suprafaţa hematiilor unde se dezvoltă pe măsură ce infecţia progresează). Succesiunea proceselor în cadrul patogenezei virale duce în final la distrugerea masei eritrocitare şi fagocitarea ei de către macrofage precum şi la apariţia siderocitelor (213). În acest sens, s-a demonstrat că eritrocitele afectate îşi reduc durata de viaţă de la 136 ± 17 zile la 28—113 zile, o mare parte lizîndu-se (175 ; 211). În sprijinul acestei teze vin lucrările lui O b a r a şi N a k a j i m a (211) ca şi ale lui M a l i s k a (163) care arată că la caii infectaţi perioada de înjumătăţire a Cr^{51} cu care s-au marcat eritrocitele coboară la 7,8—10,7 zile, în timp ce la caii indemni ea se menţine la 11,6—18,2 zile. S-a stabilit astfel că distrugerea masei eritrocitare declanşează un sindrom anemic care se instalează şi domină tabloul clinic în perioadele pirexice.

I s h i i şi I s h i t a n i (99) explică mecanismul anemiei arătînd că anemia hemolitică hipocromă care apare în A.I.E. se derulează în perioada febrilă în care are loc depresia şi invadarea măduvei hematogene de către virusul A.I.E. Această invadare are loc atît cu 2—3 zile înainte de accesul pirexic cît şi în decursul acestuia. O dată încheiată pirexia dispare şi sindromul anemic, astfel că între accesele febrile valorile eritrocitare sînt nemodificate. În caz că accesele termice se repetă, funcţia hematopoetică a măduvei osoase îşi reduce potenţialul hematofactor, valorile eritrocitare coborînd la 4—6 mil./mm³. Rata anemiei se dovedeşte crescută cînd accesul febril este mai

puternic și de durată, respectiv cînd se înregistrează așa-numitul paroxism organic (332). Dimpotrivă, cînd anemia atinge apogeul, după mai multe paroxisme, ea începe să diminue chiar dacă accesul febril următor este mai puternic (99). Rezultă că anemia este consecința, pe de o parte a hemolizei intra- și extravasculare, iar pe de alta a scăderii funcției hematopoetice medulare (176). S-a arătat totodată că procesul patogenezei virale este influențat de acțiunea elementelor monocitare al căror nivel în sînge crește în tot acest interval. După B a n s k (14) monocitele sînt implicate mai degrabă în hemoliza extravasculară în care ele joacă un rol determinant.

A doua ipoteză (b) pretinde că S.R.E. este hiperplaziat ca urmare a incitării lui de către virusul A.I.E. De aici rezultă o intensă proliferare a acestui sistem la nivelul extra și endovascular. Celulele S.R.E. fagocitează hematiile scoase din circulație, iar hemoglobina rezultată este transformată în hemosiderină. Procesul se desfășoară cu deosebire la nivelul ficatului și splinei, el vizînd metabolismul fierului urmare căruia are loc depunerea hemosiderinei. În esență, în acest caz are loc un transfer intens de hemosiderină în ficat concomitent cu o remarcabilă descreștere a pigmentului hemosiderinic în splină (100). Acest proces începe o dată cu primele simptome clinice de A.I.E. (212) și cuprinde în esență dereglarea metabolismului fierului, respectiv perturbarea sintezei proteinei feritine (210). Pornind de la faptul că feritina liberă apare în circulația sîngelui concomitent cu debutul febril și că nivelul ei de creștere aici este proporțional cu severitatea procesului infecțios (ridicat în pirexie și scăzut în remisie) se explică de ce feritina depozitată inițial în celulele reticulo-endoteliale din splină se eliberează sub acțiunea virusului A.I.E. și intră astfel în torentul circulator sangvin. Aici feritina este preluată de către celulele hematice pe care I s h i i le-a numit de aceea sideroleucocite sau siderocite (100), care se depozitează în ficat cu deosebire în celulele Kupffer. În fond siderocitele nu sînt altceva decît derivate ale celulelor S.R.E., monocite, leucocite neutrofile care s-au profilat pe funcția de transportori ai feritinei în ficat (212).

Cea de a treia ipoteză (c) se bazează pe faptul că virusul afectează organele care dețin principalele funcții vitale, iar perturbațiile trofice umorale și tisulare, ganglionare și endocrine se repercutează asupra activității cardiovasculare. De asemenea, ganglionii limfatici suferă modificări funcționale ca

urmare a formării celulelor „L” (limfocite mari) și „r” (limfocite mici). Celulele „L” numite și bazofile au fost considerate producătoare de anticorpi (321). Celulele „r” studiate în diferite faze de evoluție, cu ajutorul microscopului electronic, s-au dovedit a fi limfocite normale dar care s-au supradimensionat în țesutul limfatic (340). Cu referire la leziunile ganglionare, Yamagiwa și Ono (336) inițiind un studiu amplu asupra aspectelor citomorfologice în evoluția procesului infecțios consideră că A.I.E. este similară intoxicației cronice proteinice și limfadenozei. De aici și sugestia autorilor ca A.I.E. să fie încadrată în grupul leucozelor leucemice.

Referitor la perturbațiile trofice umorale, tisulare și endocrine care influențează funcțiile cardiovasculare, acestea se traduc, de regulă, prin infarct miocardic asociat cu tromboza coronariană sau simplu tromboza coronariană. Acest aspect a fost constatat la 22 cabaline din 646 examinate post-mortem în cadrul Institutului veterinar din Leningrad (55). În Mexic s-au înregistrat leziuni de bloc atrioventricular, miocardită și infarct miocardic la unele din solipelele cu A.I.E. (248).

4.4.1. ROLUL COMPLEXELOR IMUNE

A fost stabilit că unele leziuni ale cailor infectați reprezintă aspecte intermediare ale mecanismului imunologic. Ele se definesc în decursul procesului infecțios ca fiind rezultatele acțiunii complexului inseparabil virus-gamaglobulină (179). Se susține astfel că 99% din virusul infectant, prezent în sângele cailor bolnavi, se află sub formă de complexe virus-anticorpi. La rîndul lor anticorpii ca și factorul C_3 (complementul) dispar la un moment dat din sânge aproape în totalitate și se regăsesc în leziunile de glomerulită ale cailor cu forme acute de A.I.E. (12). Depozitarea pe membrana bazală glomerulară a factorului C_3 și a gamaglobulinei în decursul procesului infecțios, respectiv instalarea glomerulitei explică măcar și parțial baza imunologică a acestui proces în A.I.E. Rezultă că aceste complexe imune formate în sânge și țesuturi sînt responsabile de majoritatea modificărilor induse în celule și țesuturi (anemie, glomerulo-nefrită, vasculită etc.) (77). Astfel, se explică și de ce solipelele cu A.I.E. tratate cu medicație imunosupresoare nu mai manifestă leziuni hepatice și renale (83).

4.4.2. FENOMENE IMUNOPATOLOGICE

Tom a (312) arată că evoluția A.I.E. și geneza leziunilor pare să se afle direct sub influența fenomenelor imunopatologice. La rîndul său Hallauer (77) susține că airdoma altor infecții virotice cronice (choriomeningita limfocitară a șoarecelui, boala Aleutină a nureilor, pesta porcină africană, leucemia murină etc.), și în cazul A.I.E. modificările hematologice (anemie, hipergamaglobulinemie, prăbușirea complementului) și alterările patologice din țesuturi și organe (splenomegalie, limfadenopatie, hepatită, vasculită, glomerulo-nefrită etc.), sînt consecința nu atît a patogenzei virale cît și mai degrabă a unei reactivități imunologice a gazdei. Complexele imune care se formează în sînge și țesuturi în perioadele acute ale bolii activează complementul și induc astfel efecte pirogene, citolitice și phlogogene (77).

McGuire și Gorham (175) arată că hematiile încărcate cu complement (C_3) și anticorpi specifici virali sînt în măsură să explice mecanismul imunologic al hemolizei. Astfel, așa cum s-a arătat de către Hallauer (76), virusul A.I.E. se absoarbe pe eritrocitele ecvine după care are loc hemoliza ca urmare a acțiunii sistemului citolitic virus-anticorpi-complement.

Este, de asemenea, aproape sigur că și autoanticorpii din clasa IgM (hemaglutinina rece și caldă) sînt implicați în procesul de anemiere cu toate că astfel de autohemaglutinine denotă titruri scăzute în A.I.E.

S-a stabilit totodată că în patogenzeza anemiei intervin în afara factorilor umorali și unele elemente celulare ale sistemului fagocitar, respectiv monocite și macrofage tisulare, care în timpul accesului febril cu anemie puternică, demonstrează o activitate intensă eritrofagocitară (77). Spre a dovedi aceasta, Banks (14) a demonstrat că „in vitro” monocitele activate ale virusului A.I.E. au atras sub formă de rozetă în jurul lor eritrocitele sensibilizate.

Experimental s-a demonstrat că unele leziuni tisulare frecvente în A.I.E. au putut fi reproduse prin inocularea în capilarele sangvine și în unele organe a complexelor imune hematogene. Astfel, au putut fi induse glomerulo-nefrite benigne și vasculite responsabile de hemoragiile peteșiale de pe seroase și mucoase (77).

4.5. PORTAJUL ȘI EXCREȚIA VIRALĂ

Ca un animal să fie considerat purtător viral este suficient să se fi contaminat cu virusul A.I.E. și să fi febricitat cel puțin o dată, fie și numai 24 ore (88). Deși K e m e n (120) susține că ecvinele cu A.I.E. formă latentă naturală nu constituie decât rareori un pericol de contaminare, experimental s-a demonstrat că 1 ml dintr-o diluție 10^{-6} ser de purtător viral (223) ca și o înțepătură de muscă hrănită inițial pe un cal asimptomatic înaintea inoculării cu cel puțin 31 zile și care a rămas apirexic după aceea încă 87 zile (121) este în măsură să inducă infecția la un animal receptiv. Este adevărat arată G r e e n (74) că în condițiile infecției naturale acest lucru se realizează extrem de rar, respectiv în proporție de numai $1:3 \times 10^5$ sau $1:3 \times 10^6$ cazuri; și totuși, chiar la această mică probabilitate, transmiterea infecției nu poate fi ignorată dacă avem în vedere nivelul viremiei în continuă fluctuație. În afară de aceasta, caii anemolatenți pot suferi o recidivă cu exprimare clinică urmare a unui stress indus prin factori fizici (efort, călduri excesive, geruri aspre), sau chimici (substanțe imunosupresoare) ori biologici (antigene, gestație etc.). În astfel de cazuri, transmiterea infecției A.I.E. are terenul pregătit pentru propagare. Astfel, transmiterea infecției este și rămâne o problemă de șansă. T a s h j i a n (292) citează cazul unui ponei de experiență care a păscut timp de 1 an alături de cai anemolatenți fără a se fi contaminat în timp ce în alte împrejurări caii care au conviețuit prin coabitare stînd în același adăpost cu purtătorii virali, s-au infectat (24). Oricum, purtătorii virali pun serviciilor veterinare și crescătorilor de cabaline, cele mai dificile probleme în legătură cu măsurile de profilaxie și combateră a A.I.E. (65).

Cît privește excreția virală F i e l a s și L a r s o n (65) ca și P e a r s o n (223) arată că virusul A.I.E. este prezent de regulă în toate țesuturile organice și produsele secretoare și excretoare de-a lungul întregului proces infecțios. K o n o și col. (144) susțin totuși că urina și materiile fecale nu conțin virusul A.I.E. decât în formele și stadiile de viremie maximă (supraacută și acută pirexică).

5. TABLOU CLINIC

5.1. GENERALITĂȚI

Coggins (46) arată că într-o zonă epizootică numai o parte din cai se contamenează, iar din aceștia mai puțin de jumătate exprimă boala în mod clinic. Petrović și col. (231) susțin chiar că în Croația formele clinice reprezentau în 1972 doar 0,8—2,2% din totalul efectivului infectat. Cherman și col. (37) afirmă că A.I.E. evoluează în majoritatea cazurilor ca purtători asimptomatici și numai într-un număr restrâns ca forme cronice care ajung la „recăderi”. Numai o mică parte din animale exprimă infecții în mod clinic, iar din acestea numai circa 30% ajung la exitus.

Orice cal infectat, indiferent că exprimă sau nu boala clinică, parcurge obligatoriu o perioadă de incubație, după care intră sau nu în stadiul pirexic și apoi manifestă una din formele clinice ori subclinice.

5.2. PERIOADA DE INCUBAȚIE

În infecția naturală, perioada de incubație, la cal, se derulează în limite largi: 2—4 săptămâni după Ishii și Ishitani (99), 15—30 zile până la 2—3 luni după Coggins (46) și 57 zile după Burki și col. (30). Acest interval se poate reduce în condițiile infecției experimentale la 4—8, uneori 10—20 și cu totul excepțional 90—100 zile (71). Kemény și col. (122) au stabilit o perioadă de incubație de 6 zile în cazul când animalul a primit i.v. 100 ml ser integral recoltat de la un ponei cu formă acută și de 23—30 zile dacă i s-a inoculat 1 ml dintr-o soluție de 10^{-6} , respectiv ultima diluție infectantă. Fortner (66) constată că perioada de incubație în cazul inducerii A.I.E. prin insecte hematofage contaminate artificial, este în medie în jur de 34 (21—51) zile.

5.3. FORME CLINICE

Exprimarea clinică a infecției la cal este de regulă apanajul unui proces infecțios recent, după cum formele cronice și latente se înregistrează mai cu seamă în focarele vechi (302). Aceasta nu înseamnă că imediat după infecție unele animale să nu prezinte o formă subclinică primară, iar altele din focare vechi să nu manifeste o recădere bruscă în forma acută, ajungînd la exitus în cîteva zile sau ore (103).

Exprimarea clinică este de fapt expresia nivelului ridicat al virusului în sînge și țesuturi. În funcție de acest nivel, arată Möhlmann (188), barierele naturale organice cedează, virusul se propagă în organism, iar infecția se exprimă clinic printr-un acces febril care reprezintă forma acută (sau de acutizare a unui proces latent); cînd nivelul virusului este redus, barierele organice nu sînt depășite, astfel că forma de exprimare a A.I.E. rămîne latentă. Dacă viremia este stopată, infecția devine „mută”, animalele rămînînd purtătoare de virus pentru tot restul vieții lor (188).

Formele de exprimare ale infecției A.I.E. nu sînt în general unanim acceptate. Unii autori consideră că A.I.E. se exprimă sub formă supraacută, acută, cronică și latentă (71); alții nu menționează forma supraacută (238) sau prezintă forma acută concomitent cu forma subacută (99). Dreguss și Lombard (57) descriu în afară de forma latentă și o formă mută sau inaparentă. Toma și Goret (301) arată că prezentarea A.I.E. în diferite forme clinice este cu totul artificială, astfel de forme fiind greu de delimitat, orice combinație fiind posibilă. Nusbaum (209) descrie totuși detaliat multiplicarea formelor de exprimare a A.I.E. și subtilitățile acestora.

Forma supraacută. Este atît de rară încît unii autori (99; 103; 238) o și ignoră. Această formă apare cu deosebire la tineretul ecvin infectat natural sau experimental cu doze mari de virus și are întotdeauna un sfîrșit letal. Exprimarea clinică este deosebit de gravă și se traduce printr-un debut brusc cu hipertermie puternică ($40-42^{\circ}\text{C}$) abatere, anemie, anorexie, albuminurie marcantă, oboseală, transpirație și nesiguranță în mers, în special a trenului posterior (71). Animalele tinere, mai rar cele adulte, urmare a localizării virale gastrointestinale, prezintă o enterită hemoragică epuizantă (17), adesea însoțită de hemoglobinurie și icter (65). Mînjii sugari prezintă un sindrom cardiopulmonar grav. În astfel de cazuri respirația este dis-

pneică, suflul tubar intens, pulsul accelerat (50/min), bătăile cordului slabe, aritmice, cu zgomotele diastolice prelungite sau dedublate. Evoluția procesului infecțios este rapid, exitusul survenind în 2—3 zile cu sau fără exteriorizarea anemiei, edemelor și leziunilor organice precum și cu absența răspunsului imun (65).

Forma acută (tifo-anemică). Este evidentă în mod obișnuit în zonele sau unitățile în care boala apare primar. Caracterul septicemic se exprimă cu deosebire printr-o febră ridicată ($39-41^{\circ}\text{C}$) care cu mici oscilații se menține pe tot parcursul evoluției procesului infecțios. Analiza graficului termic (fig. 7) scoate în evidență caracterul remitent sau continuu al febrei în această formă ca și aspectul ei difazic : inițial apare un acces febril discret (39°C) urmat apoi de o replicare masivă virală pe parcursul a 48—72 ore când titrul viral poate atinge 10^6 DIC 50/ml sînge integral. Replicarea are loc la nivelul macrofagelor care o dată infectate sînt apoi treptat lichidate. La scurt timp apare un al doilea atac febril mult mai puternic ($40-42^{\circ}\text{C}$) și de durată (10—12 zile). În acest interval febra crește în primele două-trei zile, apoi scade cîteva diviziuni în următoarele zile fără a coborî pînă la limita fiziologică avînd astfel un aspect oscilant, ceea ce definește caracterul ei remitent. Debutul febril este adesea însoțit de un apetit diminuat, depresie, epiforă și jetaj seros. Ca urmare a febrei ridicate, animalele slăbesc progresiv, obosesc repede după un efort neînsemnat și prezintă un sindrom anemic cu tentă subicterică pe mucoasele aparente. În staționare, animalele bolnave titubează ca în cazurile de furbură. În faza inițială a stadiului acut, caili infectați sînt obișnuit seronegativi. De regulă, faza de debut a formei acute

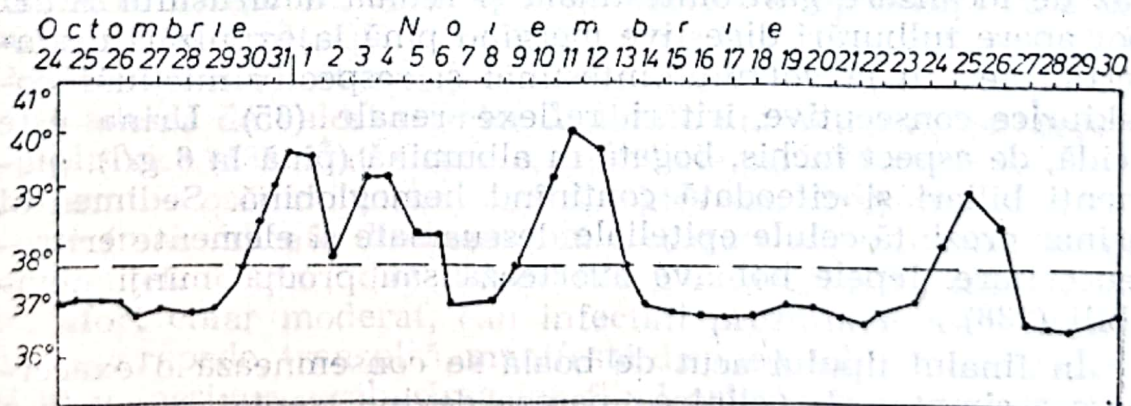


Fig. 7 — Grafic termic în forma neutră de A.I.E., infecție naturală (după Stamat, 1958)



nu este sesizată de proprietar sau îngrijitori decât în cazuri cu totul excepționale, respectiv în condițiile când boala apare la mai multe animale, formînd focare enzootice sau epizootice. Animalele aflate în acest stadiu consumă mai întotdeauna furajele fibroase și refuză grăunțele, fapt care este atribuit adesea altor cauze. De asemenea, ele prezintă o stare astenică și o pareză a trenului posterior cu hipoestezie (238). Aspectul mucoaselor este frapant : conjunctiva este edemațiată, subicterică și cu puncte hemoragice pe un fond anemic ; corpul clignotant se dovedește umed, lucios, uleios, formînd așa-numitul „ochi gras”. În plus, pe mucoasa conjunctivală, bucală, nazală și vaginală pot apare hemoragii punctiforme sau peteșiale. Acestea, situate mai ales pe mucoasa linguală și cu deosebire pe fața inferioară a limbii au fost considerate specifice pentru A.I.E. (158 ; 293). *Steck* (274) susține chiar că a constatat astfel de hemoragii la 93% din cazurile cu A.I.E. dar *Zakopol* (332), *Entchev* și *Jelev* (61) le infirmă valoarea diagnostică susținînd că le-au identificat doar la 57,48% din caii infectați și le-au constatat de asemenea la caii indemni. Pulmonul, bogat vascularizat este uneori afectat în cazuri de A.I.E. ceea ce se traduce prin respirație dispneică, polipneică subresotantă sau discordantă, iar cordul suferă tulburări de fond traductibile prin modificări de ritm și amplitudine. Pulsul devine accelerat, slab perceptibil și aritmic. Șocul cardiac apare mai pronunțat, zgomotele sistolice mai puternice, iar cele diastolice mai șterse și chiar imperceptibile (238). Tahicardia de efort, care apare după 100—300 m de alergare a animalului bolnav, se exprimă printr-o creștere de trei-patru ori a ritmului cardiac care totalizează astfel peste 100—120 bătăi pe minut. În această formă sînt manifeste adeseori edeme declive, iar în caz de localizare gastrointestinală și renală a virusului A.I.E. pot apare tulburări digestive mergînd pînă la expulzări dezinteriforme sau la volvulus intestinal și respectiv micțiuni polakiurice consecutive, iritări reflexe renale (65). Urina este acidă, de aspect închis, bogată în albumină (pînă la 6 g/l), pigmenți biliari și cîteodată conținînd hemoglobină. Sedimentul urinar prezintă celule epiteliale descuamate și elemente eritro-leucocitare. Iepele bolnave avortează sau produc mînji neviabili (238).

În finalul tipului acut de boală se consemnează o exacerbare a simptomelor clinice : pareza devine treptat paralizie a trenului posterior, iar edemele gelatinoase declive se generalizează progresiv cuprinzînd zona pectorală subabdominală,

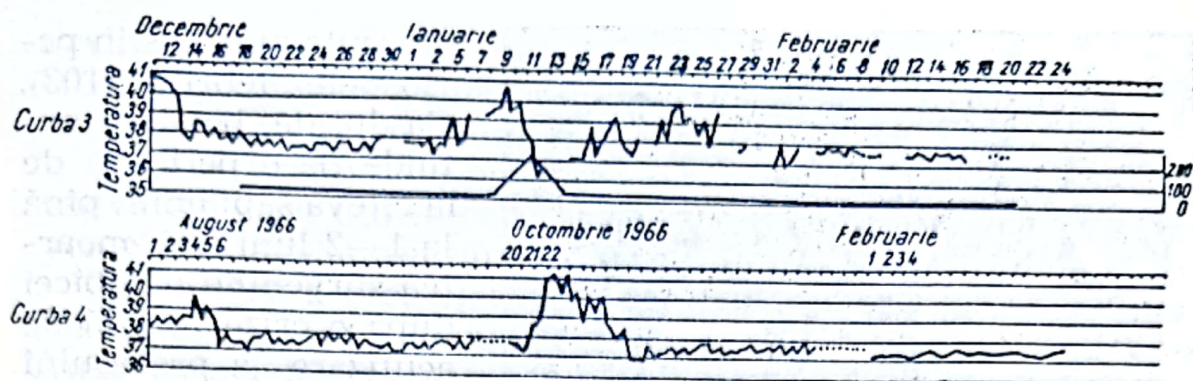


Fig. 8 — Grafic termic în formă subacută de A.I.E. (curba 3 sus) și curba sideroleucocitemiei (curba 3 jos); grafic termic la un cal cu A.I.E. formă cronică (curba 4 stînga) și apoi latentă (curba 4 dreapta) (după Goret și col., 1968)

furoul și membrele posterioare. Evoluția infecției în această formă durează 10—15 zile. Cînd temperatura corporală scade brusc ajungînd la 35°C animalele bolnave intră în colaps și apoi în exitus (142). Rata letalității poate atinge 80% și chiar mai mult (99); 10—20% din animalele care supraviețuiesc convertesc de regulă în formă subacută sau cronică (65). Examenul serologic poate fi pozitiv, slab pozitiv sau negativ.

Forma subacută. Simptomatologia este similară celei din stadiul acut, doar că este mai moderată. Evoluția procesului infecțios se desfășoară într-un interval de timp mai larg, respectiv circa 2 luni (132), cu perioade mari de remisie întrerupte de accese febrile intermitente. Astfel de accese apar după 15—30 de zile de la contaminare și se mențin în platou 1—5 zile, valorile termice nedepășind decît rareori 40°C și atunci doar pentru puțin timp (fig. 8). Concomitent cu accesele febrile evoluează sindromul anemic care poate înregistra valori de 2,5 mil. eritrocite/mm³. Animalele bolnave se epuizează treptat cu atît mai mult cu cît accesele pirexice se succed mai des. Puseele febrile sînt mai limitate în această formă fiind precedate adesea de valori termice în limite normale sau de croșete prepirexice (188). Între accese, animalele par sănătoase, variațiile termice oscilînd în limite fiziologice sau prezintă valori inverse (mai ridicate dimineața, mai scăzute seara), hemoragiile și edemele dispar, dar tulburările cardiace se mențin. După un efort chiar moderat, caii infectați prezintă accese febrile, obosesc repede, transpiră, manifestă dispnee, tahicardie de efort și mers nesigur, prăbușirea lor fiind oricînd posibilă, iar exitusul iminent (188). În această formă, caii bolnavi sînt totdeauna sero-pozitivi, titrurile anticorpilor precipitanți fiind

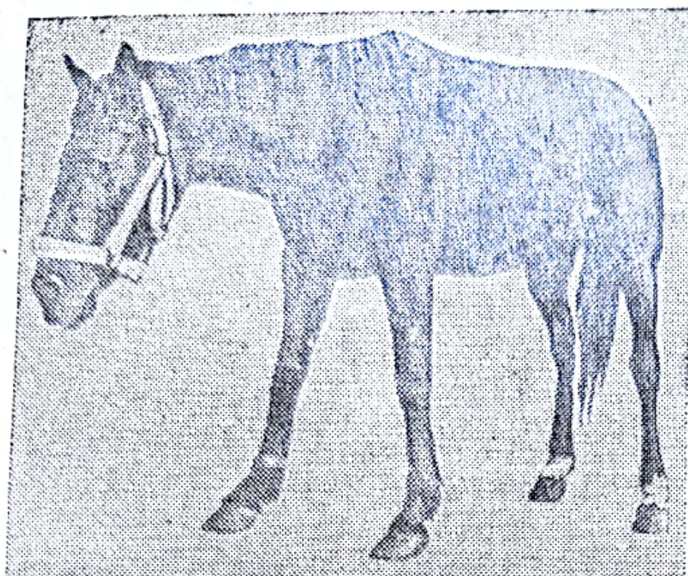


Fig. 9 — Cal cu A.I.E. formă subacută în
plin acces pirexic (după Goret și col.,
1968)

crescute mai ales în perioadele febrile (103). Ca durată, boala se extinde pe o perioadă de la câteva săptămîni pînă la 1—2 luni (65), moartea survenind de obicei după o criză febrilă de acutizare a procesului infecțios.

Forma subacută include circa 70—80 % din totalul îmbolnăvirilor clinice (236). Rata letalității este mai scăzută, comparativ cu forma acută, animalele care nu sucombă con-

vertesc de regulă în forma cronică. Acest lucru este manifest cînd animalele își ameliorează treptat starea generală, edemele dispar, iar temperatura corporală revine la normal. Examenul serologic este de regulă pozitiv, dar poate fi și slab pozitiv sau negativ.

Forma cronică. Datele statistice publicate (215) arată că majoritatea, respectiv 78% din cazuistica A.I.E. o formează animalele cu forme cronice și latente.

La cal forma cronică este frecventă mai ales în focarele vechi de boală. Coggins (46) afirmă că deși A.I.E. apare și sub forma acută, ea este în esență o boală cronică, sau după Toma și Goret (301) „o maladie cu evoluție prin crize”.

Forma cronică poate evolua primar sau secundar, în ultimul caz ea fiind urmarea unei evoluții prealabile acute sau subacute. Se pare că în etapa actuală asistăm la tot mai puține forme acute și la tot mai multe forme cronice, fapt care se explică (99) prin o atenuare vădită a virulenței tulpinilor circulante. Böhm și col. (24) explică faptul arătînd că : 1. În ultimele decenii caii nu mai sînt supuși la eforturi de muncă prelungită, ceea ce facilitează extinderea stadiului de remisie al infecției și apariția foarte tardivă a acceselor pirexice ; 2. Din cauza caracterului său benign, în această formă puseul febril rămîne adesea nesesizat. Într-adevăr, caracteristica formei cronice este febra intermitentă ale cărei accese pirexice (39—40°C)

survin la intervale de 1—6—8 luni (vezi fig. 8, curba 4 stg.) (103). În multe cazuri febra apare abia după 1 an de la infecție (99), alteori ea se manifestă după un stress puternic cauzat de eforturi prelungite, operații chirurgicale mari cu sîngerări masive etc., sau o medicație imunosupresantă (dexamethazonă, cyclophosphamidă, ser antilinfocitar, antigen rujetic etc.).

Ca urmare a acceselor pirexice, animalele se debilitază și anemiează progresiv ajungînd la 1—2 mil. hematii/mm³ (120). Unele cazuri își revin treptat, caii părăind sănătoși, cu apetit normal, cu putere de muncă obișnuită. Möhlmann (188) explică această rezistență reversibilă a cailor cu forme cronice, atît printr-o stare de adaptare a organismului dobîndită în cursul evoluției bolii cît și printr-o așa-numită hipertonie post-infecțioasă A.I.E., fenomen descris de autorii sovietici Malinin și Micchailenco (162). Alteori, caii de curse nu mai sînt capabili de performanțe așa cum s-a constatat la Royal-Jockey-Club din Hong-Kong (47).

Cînd însă febra revine, determinînd ceea ce obișnuit în A.I.E. se numește „o formă cronică acutizată“, starea animalelor se agravează. Ele își pierd apetitul, slăbesc, devin anemice, prezintă edeme generalizate (pectorale subtoraco-abdominale, genitale etc.), un echilibru tot mai precar, pînă ce îl pierde complet, căzînd în decubit și sucombînd într-un timp relativ scurt (281). În această formă, boala poate evolua mai mulți ani. Examenul serologic este intens pozitiv și slab pozitiv rareori negativ.

La asin, în mod deosebit, forma cronică prezintă o simptomatologie mai estompată. Cu totul rar, pirexia se manifestă sub forma unui acces febril, urmat de exitus, dar de cele mai multe ori animalul se remite convertînd în formă latentă. În decursul evoluției infecției A.I.E. la asin se înregistrează uneori 1—3 accese pirexice. După fiecare puseu febril animalele slăbesc brusc. Nu au fost rare cazurile cînd asinii au îmbrăcat de la început o formă cronică dar mai ales latentă rămî-nînd purtători virali pentru toată viața.

La catîr și bardou, A.I.E. evoluează de regulă cronic (ex. în Grecia și Delta fluviului Mississippi) deși sînt citate și cazuri de formă acută (ex. în Africa) în care însă simptomatologia este mai moderată iar accesele febrile, dispartate. Exitusul survine în majoritatea situațiilor cînd animalul prezintă o scădere evi-

¹ Oleinik și col. (215) arată că într-un focar enzootic vechi, circa 4% din cazurile anemolamente s-au acutizat.

dentă a ponderii corporale cu anemie avansată și paralizie progresivă.

Forma latentă. Această formă poate avea caracter primar sau secundar, în ultimul caz fiind consecința trecerii animalelor bolnave dintr-un stadiu acut, subacut ori cronic. Infecția latentă se caracterizează printr-un acces febril unic, adesea benign. Aceasta rămâne neexprimat clinic ani în șir, sau toată viața animalele fiind afebrile, cu tabloul sangvin normal sau aproape normal, cu apetitul și stare de întreținere bună, comportare vioaie și randament corespunzător în muncă. Dar peteșiile sublinguale, dacă sînt examinate ca și unele accese febrile surprinse în cazul că temperatura corporală se controlează zilnic, luni sau ani în șir, constituie indicii utile pentru un diagnostic prezumtiv (188). De aceea, în forma latentă, sesizarea infecției și combaterea ei sînt deosebit de dificile, animalele părăind sănătoase proprietarii unor astfel de cai putînd fi cu greu convinși că aceștia sînt infectați și prezintă un pericol potențial contaminant pentru congenerii lor (232). Chiar dacă în această formă virusul este cantonat mai ales la nivelul măduvei osoase și mai puțin în sînge, perioadele lungi de anemolatență însumînd 3—14 sau chiar 23 ani (71), constituie un risc permanent de infecție pentru populațiile ecvine, precum și de menținere a rezervorului de virus peren în natură. Diagnosticul în formă latentă este astăzi facilitat de serodiagnosticul modern (testul I.D.-Coggins) care poate furniza aceleași rezultate și în forma cronică.

Forma mută (inaparentă). În cadrul formei latente a fost descrisă și o așa-numită formă inaparentă sau mută (188). Se afirmă că în timp ce în forma latentă se înregistrează la sfîrșitul perioadei de incubatie un acces febril unic, de regulă $\geq 39^{\circ}\text{C}$, iar în cazul inoculării cu o tulpină omoloagă este manifestată o rezistență remarcabilă a animalelor, traductibilă printr-o imunitate specifică (premuniție sau desensibilizare), în forma inaparentă (mută), accesul febril este greu sesizabil, animalele infectate reacționînd cu totul benign la sfîrșitul unei perioade de incubatie lungi, iar după reinoculare cu o tulpină virală are loc declanșarea infecției clinice tipice (188). Steck (273) afirmă că formele inaparente se constată mai ales în zonele cronic infectate, în timp ce Möhlmann (188) le consideră apanajul inoculărilor experimentale cu doze minime de virus A.I.E.

6. TABLOU ANATOMO-HISTO-PATOLOGIC

6.1. GENERALITĂȚI

Modificările morfopatologice în A.I.E. sînt expresia alterărilor parenchimatoase, degenerărilor și necrozelor țesutului limfatic, reticulo-endotelial, tulburărilor circulatorii și activizării celulelor limfatice. Aceste modificări sînt în concordanță în majoritatea cazurilor cu stadiile procesului infecțios în care febra, simptomele clinice și leziunile tisulare sînt, de regulă, interdependente (24). În cadrul examenului morfopatologic prezintă interes, pentru diagnosticul A.I.E., modificările anatomice și histologice.

6.2. MODIFICĂRI ANATOMICE

În funcție de durata procesului infecțios și de sfîrșitul fatal — moarte naturală în forma acută sau în urma recăderii după stadiul cronic ori sacrificare ca măsură de asanare a unui focar infecțios — la necropsie pot fi constatate leziuni variabile de la septicemie intensă cu hemoragii pe mucoase și seroase, tumefieri organice și adenopatii ganglionare pînă la absența totală a oricăror modificări (188).

Ca valoare de diagnostic, modificările anatomice în cazurile de A.I.E., luate separat nu constituie elemente caracteristice decît în 50,38% din cazuri (286); dacă ele sînt analizate „în toto” pe un număr mare de cazuri pot forma baza estimării unui diagnostic de A.I.E. (108).

În cadrul formelor clinice s-a constatat că leziunile macroscopice prezintă unele elemente de concordanță cu simpto-

matologia clinică, ceea ce impune examinarea și interpretarea lor în funcție de stadiul de evoluție al bolii.

Forma supraacută de A.I.E. prezintă în general modificări organice cu caracter septicemic : congestie generalizată a țesutului conjunctiv, a mușchilor și viscerelor, arborizație vasculară ectaziată și hipertrofie a organelor hematopoetice cu sau fără modificări de volum ale splinei, ficatului și ganglionilor limfatici (71). La mînji, mai rar la animale adulte, sînt evidente hemoragii pe endocard și seroase ca și leziuni de enterită hemoragică cu adenopatia ganglionară adiacentă.

În forma acută și subacută, caracterul septicemic se menține adesea, exprimîndu-se prin hipertrofia splinei, ficatului, rinichilor și ganglionilor limfatici. În aceste organe, ca și în submucoase și subseroase, în tractusul gastrointestinal, precum și în subepicard, subendocard și în miocard, ca și în țesutul submucos al vezicii urinare se constată hemoragii de diferite dimensiuni (puncte hemoragice, peteșii, echimoze, sufuziuni, hematoame). Astfel de hemoragii sînt observate uneori și în masa musculară. *Splina*, de aspect roșu închis, este inflamată, hipertrofiată (5—6 kg), conținînd multiple infarcte sau hemoragii subcapsulare ca și tromboze ale venelor splenice (71). Parenchimul splenic, mai ales în cazurile recent infectate, este emaciat și înrundat cu sînge necoagulat. Foliculii splenici, hiperplaziați, prezintă pe suprafața secționată a organului un aspect granular (fig. 12). *Ficatul*, hipertrofiat (pînă la 20 kg) cu margini rotunjite, avînd o consistență dură, culoare brună-roșietică sau gri-roșie, prezintă puncte hemoragice subcapsulare și în parenchim. Pe suprafața organului secționat se observă desenul lobular bine circumscris. *Rinichii*, măriți în volum (1,5—2 kg) (71), anemiați or de aspect icteric, conțin pe suprafața lor și în zona corticală precum și în bazinet, numeroase puncte hemoragice. *Cordul*, afectat în 80% din cazuri (71), prezintă un miocard degenerat de aspectul lutului (86) cu numeroase hemoragii subepicardice, subendocardice și miocardice (fig. 13). În cavitățile cardiace și în vasele sangvine adiacente (aortă, cavă) sînt prezente cheaguri de fibrină de aspect gelatinos. *Ganglionii limfatici*, de la nivelul hilului splenic, hepatic și renal, sînt inflamați și hemoragici, avînd mărimea unei nuci și chiar mai mari. Pe secțiune apar umectați, congestionati și cu

hemoragii punctiforme. Astfel de hemoragii se constată și pe mucoasele și seroasele tractusului digestiv. *Sîngele*, roșu deschis, este coagulat sau necoagulat, în ultimul caz de consistență apoasă. *Măduva oaselor lungi* evidențiază integral sau parțial aspectul roșu de fetalizare care contrastează cu culoarea ușor gălbuie a țesutului organic neafectat.

Forma cronică se caracterizează prin leziuni inflamatorii și hemoragii mai mult sau mai puțin pronunțate, evidente atât în splină, ficat, rinichi, cât și în ganglionii limfatici, cu deosebire în perioadele de remisie prelungită. În schimb, sindromul anemic este demonstrat de paloarea organelor parenchimotoase. *Splina* prezintă o capsulă îngroșată și un parenchim de consistență elastică. Hemosiderina descrescînd cantitativ în acest organ influențează aspectul pulpei care devine roșiatică, în timp ce foliculii apar ectaziați. Tumefierea ganglionului limfatic splenic este, în această formă, un indiciu patognomonic în diagnosticul A.I.E. *Ficatul*, inflammat și de consistență dură, conține o cantitate redusă de sînge. Ca urmare a congestiei venei centrolobulare și degenerării grase a lobului hepatic, pe suprafața organului se proiectează evident desenul lobular : centrul brun închis al lobului este imprimat cu diferite puncte hemoragice pe un fond gălbui sau verde măsliniu, dînd aspectul de „ficat muscat”. *Rinichii*, ușor decolorați, evidențiază adesea focare lineare cenușii-albe de nefrită epitelială cu prezența de celule limfoide proliferate și localizate de-a lungul capilarelor sangvine în cortexul renal și în zona medulară (fig. 12). *Ganglionii limfatici* din hilul splenic, hepatic și renal apar în faza inițială a procesului infecțios deosebit de inflamați și hipertrofiați pentru ca ulterior să sufere un proces regresiv. *Măduva oaselor lungi* indică focare inflamatorii cu zone de fetalizare roșie care contrastează cu fondul medular indemn (fig. 13). În unele cazuri, țesutul medular este în totalitate de aspect mucos (99).

Forma latentă. Cadavrele cailor necropsiați nu prezintă în general nici un fel de leziuni macroscopice. Rareori se constată *modificări splenice*, exprimate printr-o culoare roșie deschisă cu foliculi limfoizi hiperplaziați, evidenți pe secțiune. *Cordul* etalează uneori hemoragii subendocardice vechi, de aspect brun sau zone de scleroză (238).

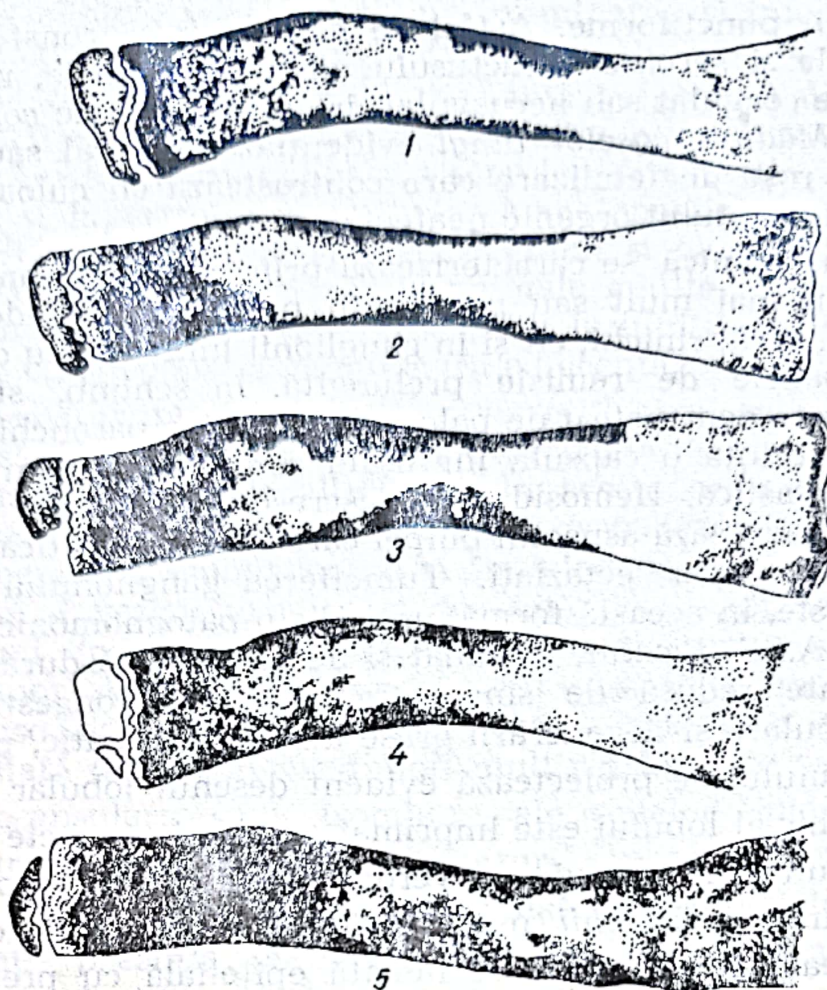


Fig. 13 — Ilustrarea distribuirii modificărilor celulare în măduva osoasă din diafiza femurală :

1 — cal sănătos ; 2 — forma acută ; 3 — tipul subacut ; 4 — primul stadiu cronic ; 5 — formă cronică (după Yamamoto și Konno, 1967)

6.3. MODIFICĂRI HISTOLOGICE

Comparativ cu leziunile anatomice, modificările histologice în A.I.E. prezintă caracteristici care pot constitui baza unui diagnostic de certitudine, mai ales în formele acute (108). După Surdan și col. (286) examenul histologic poate diagnostica 80,43% din formele acute și numai 28,09% din cazurile cronice de A.I.E.

Modificările histologice care sînt manifeste în A.I.E. vizează ficatul, splina, ganglionii, rinichii și cordul. Leziunile acestor organe sînt mai expresive ca urmare acceselor febrile și mai

puțin evidente la animalele moarte sau sacrificate în stadiul de remisie cînd pot chiar absentă. De aceea, un rezultat histologic negativ în cazuri suspecte nu exclude A.I.E. După R o m b o l i și col. (253) limitele diferitelor stadii de evoluție ale A.I.E. sînt greu de diferențiat prin examen histologic. Totuși, unele aprecieri pot fi formulate mai ales dacă datele obținute se coroborează cu rezultatele examenului hematologic și clinic.

În stadiul prefebril al A.I.E., leziunile histologice sînt absente; apar în schimb unele modificări ale tabloului hematologic care pot fi valorificate.

Etapa pirexică se caracterizează prin leziuni histologice prezente cu deosebire în ficat, încă la 4 zile de la începutul accesului febril primar. Aceste leziuni indică o activare a endoteliului capilarelor venei porte cu evidențierea celulelor Kupffer hipertrofiate și cu prezența celulelor limfoide în capilarele hepatice.

În etapa postpirexică se manifestă o hemosideroză masivă a celulelor Kupffer precum și prezența de infiltrate limfoide intracapilare ori periportale, însoțite de o degenerescență grăsoasă centrolobulară a celulelor hepatice. În splină, începînd de la 7 zile după prima pirexie se constată o scădere a hemosiderinei și dimpotrivă o creștere a numărului celulelor limfoide, care se extind în întreg parenchimul splenic comprimînd celulele parenchimotoase din pulpă, încărcate cu fier. În acest fel, fierul dispare din splină iar celulele limfoide se dezvoltă marcînd limitele foliculilor splenici (188).

În forma acută și subacută, elementul caracteristic îl constituie leziunile constatate în țesuturile limfatice din splină, măduvă osoasă și ganglioni și anume necrozele limfocitare ca și absența celulelor mature în foliculii limfatici și în centrii embrionari. În formele subacute prezența celulelor bazofile rotunde predomină tabloul lezional (339). Este evidentă de asemenea o reacție histiocitară, care se exprimă prin infiltrarea histiocitelor în endoteliile sinusoidale hepatice și în tecile lui Glisson.

Ficatul evidențiază lobulii alterați, atît în partea lor centrală cît și periferică, structura tisulară apărînd complet estompată. Celulele Kupffer și macrofagele libere din aceste zone conțin „depozite” de hemosiderină (fig. 14). În formele subacute, procesul de proliferare al S.R.E. domină tabloul patologic. Focarele celulare de origine reticulo-endotelială și limfoidă sînt diseminate în jurul capilarelor, numărul lor fiind în raport cu gradul de evoluție al procesului infecțios (188).

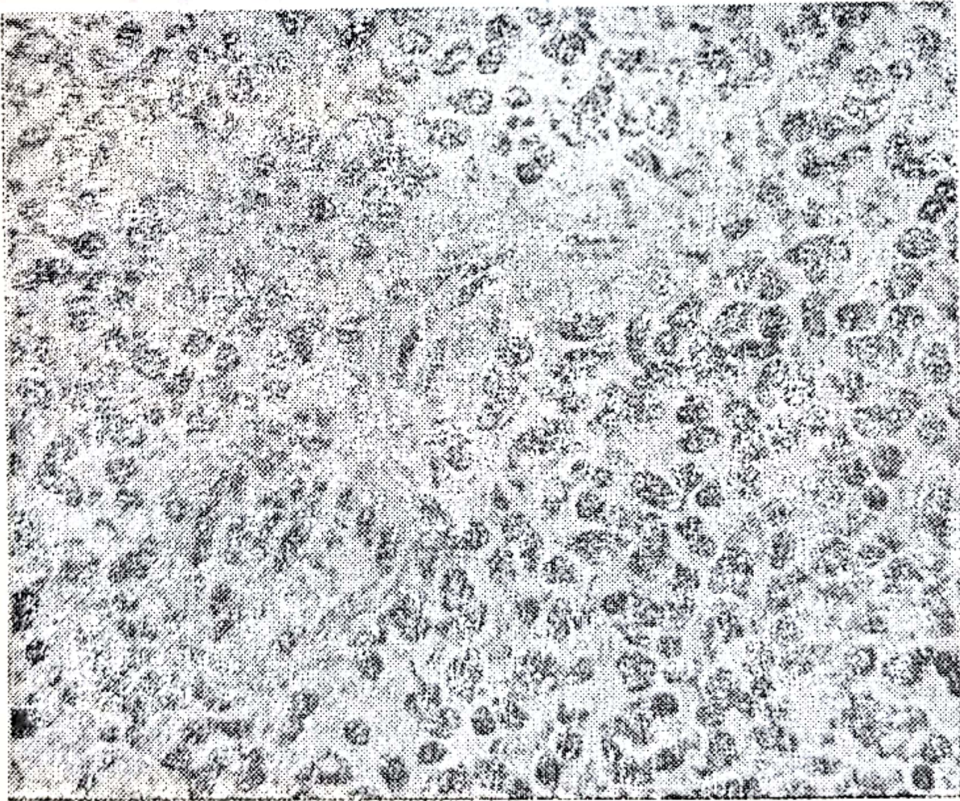


Fig. 15 — Splină de cal cu A.I.E.: celule bazofile rotunde și histiocite care proliferază în stratul extern al arterei centrale. Colorație H.E. (după Yamamoto și col., 1972)

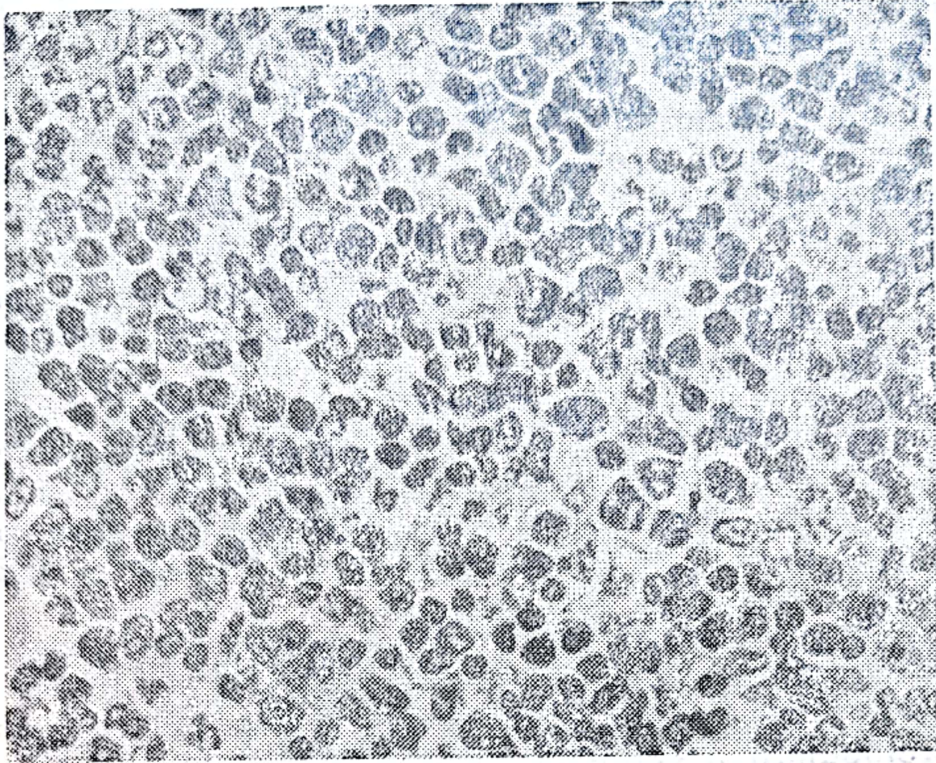


Fig. 16 — Ganglion limfatic splenic cu proliferarea celulelor bazofile rotunde și prezența reticulocitelor în țesutul limfoid (după Yamamoto și col., 1972)

Splina prezintă o pulpă hiperemiată și hemoragică. În jurul vaselor sanguine sau în apropierea fasciculelor conjunctive se înregistrează focare limfo-histiocitare. Cu deosebire în forma subacută, S.R.E. din splină este puternic activizat, iar celulele limfoide, bazofile rotunde (fig. 15) proliferază în jurul arterelor centrale și arteriolelor din pulpa splenică (339). În forma acută, hemosiderina descrește cantitativ sau chiar dispare complet din parenchimul splenic, în timp ce în formele subacute se constată prezența a numeroase eozinofile (8).

Ganglionii limfatici exprimă o proliferare celulară în foliuli și sinusuri ca și în țesuturile limfoide din jurul cordoanelor trabeculare. În masa ganglionară este evidentă proliferarea celulelor bazofile rotunde (fig. 16), denumite încă și celule „L”¹, sau limfocite mari generatoare de anticorpi, alături de care figurează limfocite mici sau celule „r” (336).

Rinichii conțin hemosiderină în tubii uriniferi proximali. Adesea se constată o glomerulită, iar pe membrana bazală este evidentă prezența gamaglobulinei și a factorului C₃ (12).

Măduva osoasă este diseminată cu hemoragii punctiforme și cu insule discrete de hemosiderină. Celulele hematopoetice prezente în masa medulară, în număr mare, denotă o activitate intensă a acestora.

Sistemul nervos central: sînt evidente distrofii neuronale, urmate de satelitoze, neuronofagii, edeme, hemoragii sau focare proliferative limfoido-monocatoide.

Forma cronică. Leziunile histologice sînt deosebit de marcate (135 ; 83), caracteristică fiind proliferarea limfoidă cu modificări consecutive ale țesuturilor, respectiv activizarea foliulilor limfatici și a centrilor embrionari, precum și dezvoltarea celulelor limfoide în dauna histiocitelor. Multiplicarea celulelor limfoide (L și r) este atît de evidentă, încît domină tabloul histopatologic. O mențiune specială se impune pentru celulele limfoide mici „r” și fibrele argirofile care apar mai ales în țesutul reticular din stratul adventicial al vaselor sangvine, cu deosebire la animalele care nu febricitază (99).

Splina evidențiază în jurul arteriolelor din pulpă, discrete proliferări de celule limfoide mici manifestate în special la subiectele care febricitază primar sau prin recădere și mai puțin la animalele apirexice la care predomină fibrele argirofile.

¹ Celulele „L” au fost identificate și în singele periferic astfel: 1,8%, în formele acute ; 3,8% în stadiul subacut ; 1,4% în tipul cronic ; 0,8% în forma de recădere (336).

Celulele limfoide mici sînt de asemenea evidente în acinii glandulari, vena portă și în tecile lui Glisson (340).

Ficatul prezintă cu predilecție fibre de reticulină și celulele hepatice cu modificări care afectează mitocondriile. Este de asemenea evidentă o degenerescență de aspect vacuolar, ca și absența hemosiderinei în celulele Kupffer.

Ganglionii limfatici arată că hemosiderina dispare în aceste organe, iar predominanța celulelor limfoide este marcantă (340). Spre finalul procesului infecțios se remarcă apariția fibrelor de reticulină (71).

Rinichii denotă o infiltrație mai puțin histiocitară și mai ales limfocitară cu deosebire în perimetrul vaselor și glomerulilor; de asemenea, este evidentă, prezența unor macrofage cu conținut glanular de hemosiderină, iar în final o proliferare de țesut scleros (71).

Cordul manifestă o infiltrație conjunctivală marcantă cu apariția de țesut collagen. Fibrele miocardice denotă o degenerescență tipică, tradusă prin tumefierea celulară, rarefacția miofibrilară pînă la dispariție, vacuolizarea sarcoplasmică și a nucleelor, precum și o infiltrație limfoidă intercelulară cu deosebire la nivelul fascicolului lui Hiss și a nucleului Aschoff-Tawara (71). Șerbănescu și Drăghici (262) arată că fără a fi specifice, aceste modificări explică tulburările cardiace care au loc în cazurile de A.I.E.

Măduva osoasă prezintă modificări mai puțin marcante în cazurile de remisie și mai pregnante în forme de acutizare a bolii, care se traduc prin aspecte nete de măduvă fetalizată roșie prin contrast cu aspectele indemne, gălbui. Prezența celulelor hematopoetice la nivelul măduvei osoase este slab reprezentată în cazuistica cronică a A.I.E.

Glandele endocrine. Testiculul și ovarul indică adeseori o degenerescență care antrenează dispariția celulelor germinale. Această degenerescență poate afecta 70% din celulele ovariene (71), fapt care explică unele minusuri în procreare și evoluția *ante și postpartum* a fetoșilor.

Fig. 10 — Splină de cal cu A.I.E. : splenomegalie cu marginele îngropate în zona mediană infarctizată (după Goret și col., 1968)



Fig. 11 — Cord cu sufuziuni hemoragice de-a lungul fibrelor musculare miocardice (după Goret și col., 1968)



Fig. 12 — Rinichi de cal cu A.I.E. : nefrită epitelială (după Goret și col., 1968)



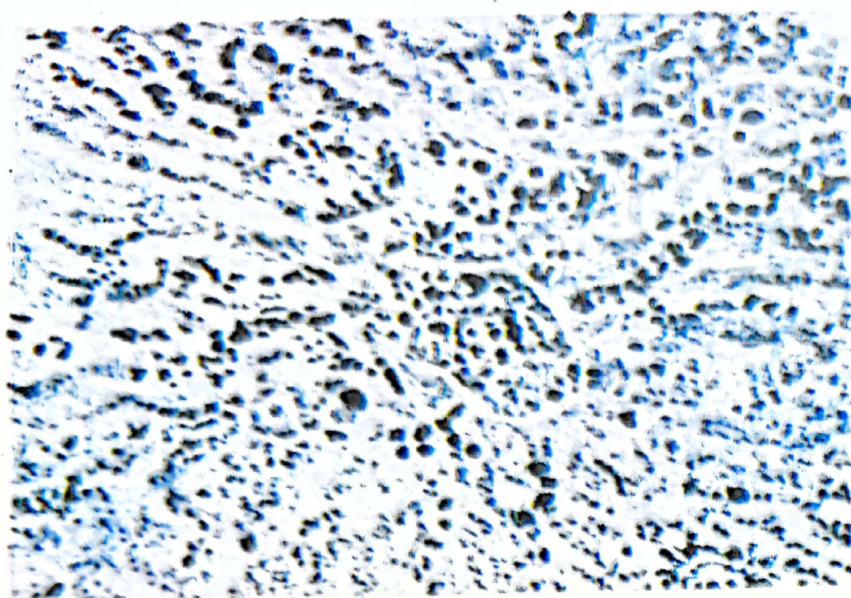
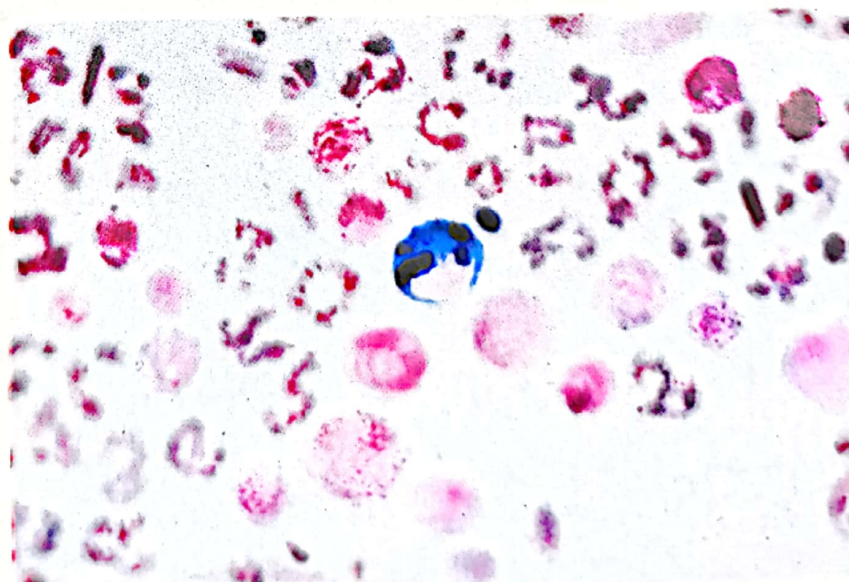


Fig. 14 — A.I.E. ficat de cal : hemosideroză în celulele lui Kupffer (după Goret și col., 1968)

Fig. 18 — Siderocit cu citoplasmă colorată în albastru închis (după Goret și col. 1968)



7. IMUNITATEA ÎN ANEMIA INFECTIOASĂ ECVINĂ

7.1. GENERALITĂȚI

Anemia infecțioasă ecvină este prin definiție o maladie imunitară (77). La întrebarea dacă A.I.E. produce o imunitate postinfecțioasă de protecție, răspunsul este încă incert. În boala Aleutină a nurcilor, care are multe analogii cu A.I.E., au fost observate stări de excepție, respectiv de infecție nepersistentă, ceea ce echivalează cu o vindecare (77). O imunitate de supra-infecție a fost constatată și în cazul A.I.E. încă de către C a r r é și V a l l é e (32) care au ajuns la această concluzie după ce au observat că inoculând o tulpină patogenă la caii care erau anterior infectați, aceștia rezistau la o a doua infecție.

7.2. IMUNITATEA UMORALĂ ȘI CELULARĂ

K o n o și c o l. (143) arată că în patogeniza A.I.E. intervin cel puțin două mecanisme imune distincte : unul *dependent* de anticorpii neutralizanți, exprimând imunitatea umorală strâns legată de tulpina de virus și de momentul evolutiv în procesul infecțios ; altul, *independent* de anticorpii neutralizanți, reprezentat de imunitatea celulară bazat pe activitatea sistemului limfatic (a limfocitelor T și B, monocitelor și macrofagelor). O astfel de imunitate se instalează mai lent și survine la caii infectați după 300 zile de la infecție, explicând astfel rezistența acestor animale la inocularea cu tulpini homoloage și heteroloage (143).

Rezultă că în A.I.E. intervin două sisteme imunitare, interdependente de patogeniza ei, în care accesele febrile alternează cu perioadele de remisie. C h a r m a n și col. (37) explică astfel această interdependență : în A.I.E. ca și în leucoza bovină există

uneori o absență a răspunsului imun, previzibilă prin alterarea structurii aparatului imunologic competent, ca urmare a transformării limfocitelor B în limfocite de tip T. Așa se face că răspunsul mediat umoral (celulele B) se transformă în răspuns mediat celular (celulele T), ceea ce explică și unele rezultate variabile ale testului serologic I.D.-Coggins (77).

7.3. RĂSPUNSUL IMUN. DIFERITE TIPURI DE ANTICORPI

Este un fapt constatat că în A.I.E. anticorpii umorali se formează atât față de nucleoproteina internă, respectiv față de antigenul solubil cât și față de glicoproteina de la suprafața virionului. Față de nucleoproteina internă a virionului iau naștere anticorpi precipitanți, fixatori și inhibitori de complement etc., în timp ce față de glicoproteina de suprafață se dezvoltă anticorpii neutralizanți. Toți aceștia alcătuiesc răspunsul imun la stimulii antigenici ai virionului (fig. 17). La rândul lor fiecare din acești anticorpi intră în reacție cu antigenul corespunzător, fiind utilizați într-o măsură mai mare sau mai mică în diagnosticul A.I.E. și respectiv în identificarea tulpinilor virale.

Anticorpii precipitanți. În serul cailor infectați cu virusul A.I.E. apar precipitine sau anticorpi precipitanți corespunzători fracțiunilor antigenice G și C. S-a constatat că precipitinele apar în sângele cailor infectați între 14—45 zile (45) sau 16—42 zile (48) după infecția virală ori la 7 zile de la primul acces termic și persistă cel puțin 5,5 ani, după unii autori (178), sau toată viața, după alții (37 ; 223). În unele situații cu totul excepționale, acești anticorpi pot apare chiar la 60 zile (314).

S-a stabilit că precipitinele, detectate în faza de debut a bolii se includ în clasa IgG (289). Ele pot rămâne constante în circulația sangvină și țesuturi sau dimpotrivă să devină preponderente în fazele de criză febrilă sub formă de fracțiuni IgG și IgG(T) (182 ; 198).

În cinetica infecției, precipitinele manifestă adesea fluctuații de titru, în funcție de starea clinică a animalului bolnav. Coggins și Norcross (44) arată astfel că la 1 din 9 cai infectați experimental nu au reușit să identifice prezența acestor anticorpi din cauza titrului lor scăzut, astfel că a fost necesară concentrarea lor.

Cu referire la valoarea diagnostică, precipitinele constituie baza testului I.D.-Coggins. Acestea, puse față în față în reacție

cu antigenul respectiv, induc liniile de precipitare care stabilesc diagnosticul A.I.E.

Anticorpi fixatori și inhibitori de complement. Apariția anticorpilor fixatori de complement are loc în decursul procesului infecțios între 17—62 zile de la inocularea virusului A.I.E. (198). După 21—62 zile de la apariția lor în organism, elementul lor definitiv — sensibilizatricea, cu caracterul său fugace — dispare treptat din circulația sangvină, astfel că testul serologic, R.F.C. este mai puțin edificator (312). De menționat că deși o dată cu febra recurentă are loc replicarea virală, titrul anticorpilor fixatori de complement nu se modifică. Mc-Guire și col. (178) arată astfel că în serul cailor cu A.I.E. apare alături de IgG, o fracțiune imunoglobulinică specifică, care este o componentă a clasei IgG, corect denumită IgG (T). Studii de bază cu lactozidă anti- β au demonstrat existența în serul cailor infectați a nu mai puțin de 8 imunoglobuline antigenice

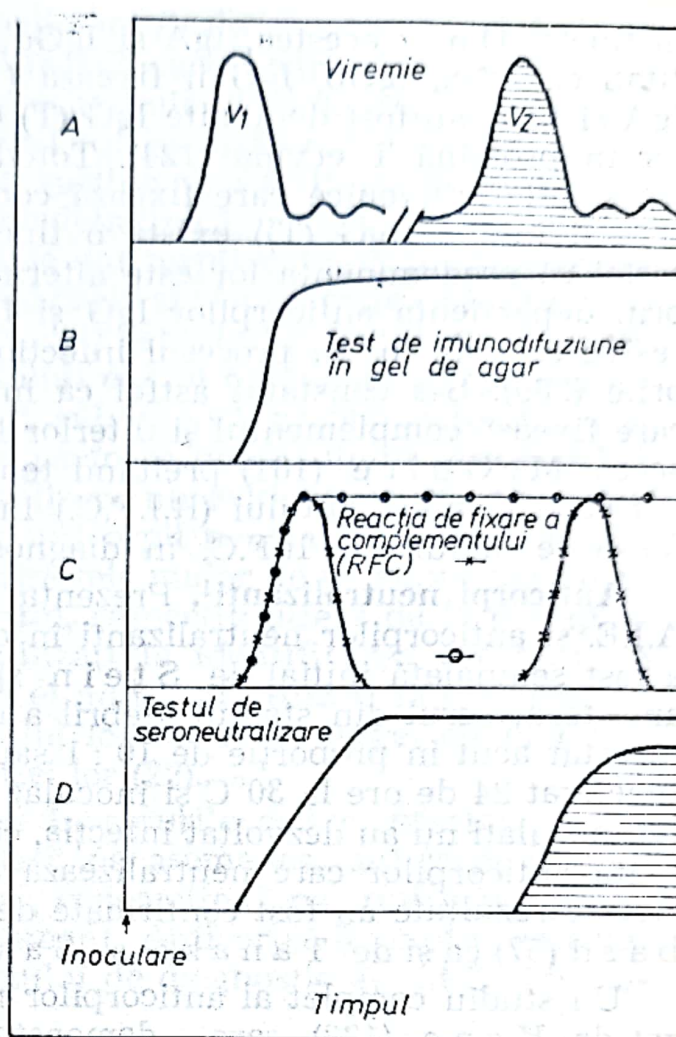


Fig. 17 — Reprezentarea schematică a răspunsului imun la caii infectați cu virusul A.I.E. :

A — gradul de viremie este variabil dar persistent. Primul acces febril este produs de un virus „V1”, în timp ce al doilea „V2” este o variantă a primului.

B — anticorpii precipitanți detectați prin testul de imunodifuzie apar între 16—42 zile după inoculare și persistă toată viața.

C — anticorpii depistați prin R.F.C. și R.I.F.C. depind de proporția IgG și IgG (T), apărând cam în același timp ca cei de la punctul B.

D — anticorpii evaluați prin seroneutralizare sînt specifici de tulpină, diferind în cazul mutantelor (V1 și V2) (după Issel și Coggins, 1979)

distincte. Dintre acestea, IgA și IgGc inhibă complementul, în timp ce IgGa, IgGb, IgG îl fixează (178). Ulterior fracțiunile IgA și IgGc au fost denumite IgG (T) ca urmare a conținutului lor în proteină T ecvină (124). Totodată s-a stabilit că între fracțiunile antigenice care fixează complementul (IgG) și cele care îl inhibă (IgG (T)) există o fluctuație continuă de titru astfel că predominanța lor este alternativă. Aceasta se explică prin dependența anticorpilor IgG și IgG (T) de sintezele succesive care au loc în procesul infecțios în cursul acceselor febrile (289). S-a constatat astfel că inițial sînt sintetizate IgG care fixează complementul și ulterior IgG (T) care îl inhibă. De aceea McGuire (181) preluînd tehnica reacției de inhibare a fixării complementului (R.I.F.C.) inițiată de Rice (247) o folosește alături de R.F.C. în diagnosticul serologic al A.I.E.

Anticorpi neutralizanți¹. Prezența concomitentă a virusului A.I.E. și anticorpilor neutralizanți în organismul cailor bolnavi a fost semnalată inițial de Stein și Gates (280), care au amestecat serul din stadiul afebril a doi cai cu serul unui cal infectat acut în proporție de 10 : 1 sau 39 : 1. Amestecul a fost inactivat 24 de ore la 30°C și inoculat la caii indemni. Caii astfel inoculați nu au dezvoltat infecția, ceea ce demonstrează prezența anticorpilor care neutralizează acțiunea virusului A.I.E. Aceste rezultate au fost confirmate de Dreguss și Lombard (57) ca și de Tanaka și Sakaki (290).

Un studiu complet al anticorpilor neutralizanți a fost realizat de Kono (138), care a demonstrat în două experiențe că la o parte din caii infectați, anticorpii neutralizanți apar între 23—120 zile de la inoculare și persistă între 490—594 zile; la unele animale, acești anticorpi au persistat toată viața iar la altele ei nu au apărut deloc². S-a arătat totodată că nivelul acestor anticorpi nu este influențat de apariția acceselor piroxice (48). Kono (138) explică prezența concomitentă a anticorpilor neutralizanți în paralel cu febra recurentă, formulînd o triplă ipoteză : 1. Numai o mică parte din virusul circulant poate scăpa acțiunii de neutralizare a anticorpilor ; 2. O pro-

¹ Între anticorpii F.C. și neutralizanți nu există nici o corelare, în timp ce anticorpii neutralizanți pot sau nu să apară la un cal infectat, anticorpii F.C. apar totdeauna (48).

² Dezvoltarea anticorpilor neutralizanți depinde în primul rînd de tulpina virală infectantă : tulpina Wyoming a declanșat apariția anticorpilor la 12 din 13 cai infectați, în timp ce tulpinile Goshun și Germană abia la 1 din 5 și respectiv din 4 cai infectați iar tulpina New-Hampshire la nici unul din 5 cai infectați (48).

porție relativ redusă de particule virale este protejată față de acțiunea anticorpilor; 3. Virusul care apare după febră este antigenic diferit, respectiv constituie o mutantă, ceea ce determină formarea de anticorpi corespunzători.

Ushimi, citat de (100) susține că activitatea neutralizantă se datorește fracțiunii gamaglobulinică a serurilor infectante. Kono (138) arată că titrurile anticorpilor neutralizanți variază în organism în limitele $1/4$ — $1/2048$ și că proporția cailor reactivi (inductori de astfel de anticorpi) este de 56% din cei inoculați. Kono (138) afirmă că deși unii cai nu posedă anticorpi neutralizanți, ei nu sînt deficitari sub raport protector imunologic. Autorul arată de asemenea că între două tulpini virale A.I.E. diferite, testul de seroneutralizare nu evidențiază reacții încrucișate, fapt explicat astfel: anticorpii neutralizanți se formează ca răspuns la învelișul glicoproteic major de pe suprafața virionului, ei fiind anticorpi de tip, respectiv diferă de la o tulpină la alta, astfel că pot fi utilizați la identificarea acestora. În pofida speranțelor investite, ei nu pot fi utilizați în diagnosticul A.I.E. atît din cauza nivelului lor redus în sînge, cît mai ales datorită iregularității apariției lor (22).

Alte tipuri de anticorpi. În serurile cailor infectați cu virusul A.I.E. au fost detectați, de asemenea, anticorpi imunofluorescenți (311) care apar concomitent cu anticorpii precipitanți și fixatori de complement. Anticorpii imunofluorescenți intră în reacție în cadrul testului de diagnostic al A.I.E., imunofluorescența indirectă.

Pe de altă parte Sentsui și Kono (265) au inițiat testul de hemaglutinare (HA) și de hemaglutinoinhibare (HI) arătînd că aceste teste se bazează pe anticorpi corespunzători care apar în sîngele animalului infectat între 60—150 zile după contaminare, persistînd în organism timp nelimitat, la titruri de pînă la $1/256$. Sugiura și Nakajima (284) arată că anticorpi detectați prin HA pasivă evoluează paralel cu precipitinele.

7.4. IMUNIZAREA ARTIFICIALĂ

7.4.1. IMUNOGENEZA. VACCINURI

În general, în bolile infecțioase virale, ficatul, splina, ganglionii limfatici — organe cu afinități virale în care are loc multiplicarea virală primară — constituie elemente de bază în

care se derulează imediat după infectare mecanismul apărării imunitare. Față de această situație — arată Möhlmann (188) — în A.I.E. lipsește tocmai timpul de organizare al apărării specifice, cele două stadii derulându-se concomitent în sine, în el avînd loc atît infectarea cît și viremia. De aceea multiplicarea virusului și viremia se înlanțuie de la cauză la efect, ele evoluînd aproape simultan, nefiind separate decît prin timpul necesar virusului să formeze generația următoare. De aici șansele minime ale organismului să învingă infecția, respectiv să intervină în stadiul viremic, apărarea fiind nevoită să succeadă viremiei și nu invers. Așa se explică dificultățile de a lupta cu A.I.E. și mai ales de a-i opri evoluția prin imunizare activă profilactică.

În decursul anilor au fost încercate numeroase produse biologice imunizante, vaccinuri inactivate sau modificate, dar nici unul nu a conferit rezultatele scontate. Eșecurile suferite în practica imunizării active a A.I.E. se explică prin gradul de imunitate, cu totul insuficientă pentru protecția organismului în care virusul persistă în circulație ani de zile după infecție, neputînd fi eliminat, și prin variantele sau mutantele nou formate față de care se induc anticorpi corespunzători. De aceea, apare deosebit de dificil să se realizeze un vaccin față de un virus care persistă în organism, fiind într-o continuă transformare (82).

Vaccinuri cu virus inactivat. A fost încercat inițial un vaccin preparat de Comisia japoneză de cercetare a A.I.E. (341), inactivat prin acțiunea căldurii (o oră la 60°C) sau prin tratarea cu tricrezol 5%. Ramon și Lemetayer (245) au supus suspensia virală acțiunii formolului, iar Balozet (10) acidului fenic, glicerinei sau bilei. Stein și Osteen (276) au conceput un vaccin din plasmă sangvină tratată cu fenol 5%, iar Dreguss și Lombard (57) au supus această plasmă acțiunii hidroxidului de aluminiu și formolului 0,4%. Bankier (11) a realizat un vaccin pe bază de virus tratat cu cristal violet și glicerină. Tabuchi și col. (287) a încercat prepararea unui vaccin folosind țesuturi S.R.E. pe care le-a supus ultrasonării, centrifugării și acțiunii formolului. Gubin și Shaburov (75) și-au pus mari speranțe într-un vaccin preparat dintr-o suspensie de hematii incluse în mediu glicerinat la care s-a adăugat chinosol 0,5% iar Klimov și col. (125) a înlocuit chinosolul cu freonul 113.

Nici unul din aceste produse biologice nu s-a dovedit a fi în măsură să confere o protecție imunitară eficientă.

Vaccinuri cu virus modificat. Dintre încercările întreprinse spre a obține un vaccin anti-A.I.E. pe bază de virus atenuat prezintă interes lucrările întreprinse de Kono și col. (140). Aceștia au trecut de 24 ori tulpina Wyoming pe culturi de leucocite ecvine după care au inoculat-o unui cal, H. 337 căruia i-au reprodus infecția.

Folosind tehnica diluțiilor limită a serului provenit de la acest cal (H 337), inoculată la alt cal, a fost izolat un virus „V 70” care după 3 treceri pe leucocite de cal își păstra integral virulența. Virusul, menținându-și potențialul infectant a fost utilizat în continuare în pasaje seriale în vederea reducerii potențialului său patogen.

Astfel, produsul V 70 este pasat de 50 ori pe culturi de leucocite ecvine și clonat de 4 ori începând de la al 43-lea pasaj. Varianta obținută este denumită „V 26”. Aceasta, în cursul celor 50 pasaje la care a fost supus virusul, și-a diminuat treptat virulența pentru că în final să nu mai fie patogenă pentru cal, deși posedă un titru de $10^{6,8} - 10^{8,3}$ D.E. 50/0,5 ml. Injectată de 3—4 ori la 11 cai între 11—110 zile, clona V 26 nu a mai indus infecția; în schimb, după 60—140 zile de la inoculare, toți caii posedau anticorpi neutralizanți la un titru ridicat. Investigațiile în continuare au arătat că ambele clone V 26 și V 70 erau identice din punct de vedere imunologic furnizând o reacție încrucișată în testul de seroneutralizare dar difereau ca patogenitate: în timp ce clona V 26 era complet apatogenă dar imunogenă, clona V 70 se dovedea virulentă și neimunogenă. Dovadă că 8 din 11 cai imunizați cu clona V 26 și reinoculați între 175—235 zile cu clona V 70 au rezistat perfect în timp ce alți 7 cai martori inoculați numai cu clona V 70, au contractat A.I.E.

Lucrurile ar fi fost în ordine dacă 7 din cei 8 cai inoculați inițial cu clona V 26 și reinoculați cu V 70 împreună cu alți cai imunizați numai cu clona V 26 injectați apoi cu o tulpină virulentă Wyoming, nu ar fi contractat infecția tipică de A.I.E. la fel ca și alți 6 cai martori. De aici, concluzia că o clonă (V 26) poate proteja cabalinele contra altei clone (V 70) provenită din aceeași tulpină primară, diferențiată doar prin numărul de pasaje, dar nu asigură o protecție convenabilă pentru tulpina inițială (309) care diferă ca antigenitate (140).

Oricum, cercetările lui Kono și col. (140) aruncă o rază de speranță asupra dezideratului mult visat că nu peste mult timp va fi preparat un vaccin eficient anti-A.I.E. (223).

7.5. FENOMENE IMUNITARE

Sero-neutralizarea virusului A.I.E. „in vivo”, încercată pe cal în urmă cu 40 de ani, a impus ca experiențele să fie repetate. Din cauza dificultăților de a se lucra numai pe această specie, rezultatele au rămas multă vreme controversate. În timp ce Kuleakov (132), Stein și Gates (280) arătau să serul ecvin anti-A.I.E. este în măsură să neutralizeze acțiunea virusului patogen, o parte din acești autori constată în alte experiențe, efecte contrarii (57 ; 280).

Astfel, inițial Stein și Gates (280) stabiliseră că serul unui cal infectat cu tulpina Wyoming este capabil să neutralizeze virusul respectiv, în timp ce serul altui cal infectat cu tulpina de virus California nu este în măsură să neutralizeze virusul tulpinilor Wyoming și New Hampshire. Este evident că în acest caz intervin diferențele imunologice ale tulpinilor virale (310).

Clarificarea problemei nu a putut fi reluată decât după ce Kobayashi și Kono (130) au definitivat metodologia cultivării virusului A.I.E. pe leucocite de cal când s-a putut trece la elaborarea unor modele experimentale de studiu ale tulpinilor de virus și de apreciere a dinamicii anticorpilor umorali. Astfel a fost pusă la punct tehnica de sero-neutralizare de către Kono (138). Autorul a inițiat testarea anticorpilor neutralizanți pe 25 de cai pe care i-a repartizat în 4 grupe inegale, infectate fiecare cu una din tulpinile de virus A.I.E. : Wyoming, New-Hampshire, Germană și Goshun. După inoculare s-a constatat că anticorpii neutralizanți au apărut doar la 14 din cei 25 cai infectați. Unii din cai nu prezentau anticorpi neutralizanți nici după un an de la infecția cu tulpina Wyoming. Constatarea aceasta l-a determinat pe Kono și col. să verifice concluziile lucrării lui Stein și Gates (280) comparând prin testul de sero-neutralizare diversele tulpini cu serurile neutralizante respective. Astfel s-a reținut un fapt semnificativ : fiecare tulpină de virus A.I.E. era neutralizată numai de serul ei homolog, ceea ce înseamnă că în cadrul tulpinilor de

virus A.I.E. există o specificitate de specie respectiv că fiecare ser poate neutraliza numai tulpina lui virală. Mai mult chiar : tulpina P 337 fiind rezultată din pasajul serial al tulpinii Wyoming ar fi trebuit să fie neutralizată de serul anti-Wyoming ; or, rezultatele au arătat că acest lucru nu se produce. Aceasta înseamnă că serul diferă în funcție de virusul A.I.E. prezent la data respectivă în sîngele animalului infectat (145). De aici concluzia că virusul își schimbă structura sa antigenică mereu în cursul evoluției procesului infecțios, serul rezultat corespunzînd structurii tulpinii virale respective la data recoltării.

8. DIAGNOSTIC

8.1. GENERALITĂȚI

Cu 30 de ani în urmă, S c h o o p (260) scria : „dacă într-o serie de boli infecțioase ale animalelor s-au realizat progrese remarcabile pe linia prevenirii și combaterii lor“ — dînd ca exemple peripneumonia, morva, pesta bovină, febra aftoasă, rujetul etc., — „în A.I.E. nu s-a efectuat nici un pas înainte, în primul rînd pentru că nu există încă o metodă eficientă de diagnostic. De aceea, boala se extinde mereu“.

Astăzi această metodă există, grație lucrării princeps a lui C o g g i n s și N o r c r o s s (44), precum și a lui N a k a j i m a și U s h i m i (198) care au pus la punct și introdus în practica de teren un test imunologic, specific și sensibil, practic și valoros. Testul se dovedește cu atît mai util cu cît confirmă formele clinice și este în măsură să depisteze infecțiile cronice și latente, care de fapt alcătuiesc majoritatea cazuisticii în A.I.E.

Cu toată valoarea incontestabilă a testului, acesta ca orice metodă serologică, are limitele, avantajele și dezavantajele lui. De aceea, în stabilirea diagnosticului de A.I.E. „nu se poate merge“ numai pe examenul de laborator, făcînd abstracție de elementele clinice și epizootologice (103 ; 184).

În fapt diagnosticul A.I.E. constituie o probă complexă în care se analizează date epizootologice rezultate ale examenului clinic și hematologic (în formele evolutive) morfopatologic, imunologic și experimental (133).

8.2. DIAGNOSTIC CLINICO-ANATOMIC

Este unanim recunoscut că diagnosticul clinic în A.I.E. este dificil (21). În faza de debut a formelor evolutive, mai ales acute și subacute, mai rar în cele cronice, A.I.E. poate fi diagnosticată pe baza simptomelor clinice și modificărilor hemato-

logice. Teoretic după 16—18 zile, practic după 30 zile de la infecție se poate apela la examenul serologic pentru confirmarea formelor sau suspiciunilor clinice ca și pentru diagnosticarea stadiilor subclinice.

8.2.1. DATE ANAMNETICE

Datele anamnetice în A.I.E. constituie elemente utile pentru diagnostic, fiind în măsură să precizeze dacă animalul a prezentat în trecut antecedente patologice, exprimate prin accese febrile, modificări de apetit, diminuarea randamentului, oboseală după efort, scădere ponderală etc., sau dacă a venit în contact cu cai suspecti de boală, în timpul activității sau la păscut.

Anamneza va trebui să stabilească, de asemenea, dacă în herghelie, gospodărie sau unitate au fost achiziționați în ultima perioadă, cai din zone sau localități suspecte sau incerte de A.I.E. Suspiciunile vor trebui îndreptate cu deosebire spre animalele din regiunile călduroase și umede sau din unitățile amplasate în perimetrul pădurilor, lacurilor, mlaștinilor, orezăriilor, adică în locuri cu circulație intensă de insecte hematofage. Interesează, de asemenea, dacă animalul a fost tratat pe cale parenterală sau în cazul mînjilor dacă provenea din ecvine cu antecedente de A.I.E.

8.2.2. TESTE CLINICE DE DIAGNOSTIC¹

Un element clinic esențial în patogenia A.I.E. îl reprezintă episodul febril, o poziție cifoasă ca în lombago sau în tetanos (236), o stare depresivă cu modificarea apetitului și slăbire progresivă, cu prezență de edeme declive în regiunea subtoraco-abdominală, a furoului și membrilor etc. Alături de aceste simptome caracteristice, mai pot apare elemente mai puțin specifice ca : sindrom de colici, avort, afectarea sistemului nervos central etc. (103).

Examinarea practică a animalului bolnav de A.I.E. începe cu observarea faciesului și a atitudinii care sînt caracteristice : abatere, prostrație, fotofobie, deconectare labială etc.

¹ Descrierea formelor clinice în A.I.E. este prezentată detaliat la pag. 58.

Controlul termic rectal furnizează adesea valori semnificative, mult peste limitele fiziologice în formele clinice. El poate fi valorificat pentru descoperirea proceselor termice la anemolatenți printr-un control termic de durată (luni sau ani).

Investigarea mucoaselor aparente — conjunctivală, nazală, labială, dar mai ales sublinguală — este în măsură să furnizeze elemente complementare pentru diagnosticul clinic. Astfel, în faza de debut a bolii, conjunctiva apare injectată, inflamată și uneori cu puncte hemoragice diseminate mai ales în zona marginală a pleoapei și pe corpul clignotant. În stadiul pirexic, mucoasele nazală și labială devin palide, în concordanță cu sindromul anemic prezent (85). Depășind etapa febrilă, mucoasele aparente prezintă puncte hemoragice expresie a fragilității capilare, determinată de tropismul virusului A.I.E. pentru pereții vaselor sangvine.

Observarea hemoragiilor sublinguale sub raport topografic și de identitate este posibilă la lumina solară mai ales dacă investigarea lor are loc cu o lupă frontală sau de mână.

Practica examenului clinic în A.I.E. se continuă cu examenul fundului de ochi — preconizat de Ghizatulian (70) — spre a surprinde hemoragiile intraorbitale rezultate din fragilitatea capilară de pe membrana retiniană.

Examenul splinei prin explorare transrectală poate surprinde rebordul acestui organ, mult mărit în volum, ceea ce constituie încă un test sau element complementar de diagnostic clinic.

Cordul, urmare a leziunilor instalate (degenerări de fibre musculare, hemoragii) în masa miocardului, suferă în activitatea sa funcțională modificări de ritm (ajungând la 70—80 bătăi/minut) și amplitudine, după un efort chiar moderat. Tahicardia de efort care se înregistrează de regulă în A.I.E. poate fi sesizată și apreciată în practica de diagnostic prin provocarea ei deliberată în cadrul probei cordului.

Valoarea diagnostică a probei cordului a fost inițial stabilită de Anastasian citat de (69) și considerată specifică în A.I.E., deși Surdan și col. (286) apreciază că la animalele cu A.I.E. și în mod deosebit la anemolatenți, aceasta este pozitivă doar într-un număr redus de cazuri. Cu toate că nu este o metodă de diagnostic specifică, proba cordului constituie totuși un test complementar deosebit de util în diagnosticul clinic al A.I.E.

Examenul edemelor declive formează de asemenea un test util pentru diagnosticul și chiar pentru prognosticul bolii. Astfel, edemele subtoraco-abdominale ale furoului și membre-

lor sînt manifeste de regulă după faza pirexică fiind predominante mai ales la cai cu forme subacute și cronice. Cînd apare tendința de generalizare a acestor edeme cuprinzînd și zona pectorală a animalului, starea clinică se consideră foarte gravă, exitusul putînd surveni în orice moment.

8.2.3. INVESTIGAREA LEZIUNILOR ANATOMICE¹

Examenul necropsic unic este în general nesemnificativ pentru diagnosticul A.I.E., leziunile nefiind specifice (286) dar coroborat pe mai multe cazuri și în context cu datele clinice, poate fi valoros. Organele splahnice ale cailor cu A.I.E. manifestă în formele clinice, modificări în funcție de stadiul evolutiv al procesului infecțios și mai ales de numărul acceselor febrile suferite de subiect.

Succint, leziunile anatomice în cazurile de A.I.E. se prezintă astfel :

- mucoasele aparente sînt palide, anemiate, cu pichetaje hemoragice, mai ales în forma acută și subacută ;

- țesutul conjunctiv subcutanat apare inflammat, subicteric, mai ales în regiunea subtoraco-abdominală, aspect care se înregistrează de obicei în stadiul cronic al infecției.

La deschiderea *cavității abdominale* se constată :

- exsudat citrin în cantități variabile ;

- seroasele, parietală și viscerală, ca și mucoasele digestivă, respiratorie și vezicală (urinară) sînt prevăzute cu hemoragii punctiforme, peteșii sau echimoze ;

- splenomegalie (5—6 kg) cu infarcte subcapsulare unice sau multiple (a se vedea fig. 10), de aspect brun, contrastînd cu fondul roșu violaceu al capsulei ; pe secțiune este evidentă o pulpă roșie închisă, ușor raclabilă (cu deosebire în formele acute), și granulară (în stadiul cronic) ;

- ficatul hipertrofiat (pînă la 20 kg) evidențiază o accentuare a desenului lobular de unde denumirea de „ficat muscat“, iar zona centrolobulară, urmare a depozitării hemosiderinei, îmbracă un aspect roșu deschis ;

- rinichii, măriți în volum (1,5—2 kg) prezintă hemoragii subcapsulare, în zona corticală și bazinet (a se vedea fig. 12) ;

¹ Leziunile histologice sînt descrise la cap. „Tablou anatomohistopatologic“.

— limfadenopatia generalizată vizează nodulii splenici, hepatici, renali și mezenterici, al căror aspect exterior este congestiv iar pe secțiune, hemoragic.

În cavitatea toracică se înregistrează :

— lichid citrin în cantități variabile cu prezență de fibrină ;

— pulmonul, ușor congestionat, nu prezintă de regulă modificări caracteristice ;

— cordul atestă în schimb alterări esențiale (a se vedea fig. 11) : zona auriculară apare inflamată, de aspect icteric, contrastând cu masa musculară subetajată, degenerată aidoma mușchiului fiert, de unde denumirea de „cord tigrat“ ; aspectul hiperemic și hemoragiile punctiforme subepicardice și endocardice se prelungesc adesea pînă în masa miocardică explicînd astfel disfuncțiile cardiace.

Măduva oaselor lungi evidențiază parțial aspectul de fetalizare roșie care contrastează cu zone de măduvă indemnă, gălbuie.

8.2.4. SEMNIFICAȚIA DIAGNOSTICĂ

A SIMPTOMELOR ȘI LEZIUNILOR

În nici o altă boală infecțioasă nu există o interdependență atît de strînsă între febră, simptome clinice și leziunile anatomice cum se remarcă în A.I.E. (54 ; 332). La rîndul lor fiecare din aceste simptome luate în parte sau coroborate pot fi interpretate ca semnificație diagnostică.

Febra continuă, uneori în platou, cu agravarea situației animalului din zi în zi și chiar din oră în oră poate constitui un criteriu util de diagnostic în formele supraacute, după cum succesiunea acceselor termice cu intercalarea perioadelor de remisie pot fi indicii prețioase în formele acute, subacute și cronice. În forma latentă, semnificația diagnostică a acceselor febrile discrete, adeseori nu poate fi valorificată, decît dacă înregistrarea termică se execută bîdiurn perioade lungi (luni sau ani).

Aspectul mucoaselor, congestiv în faza inițială, anemic în pirexie și cu peteșii sublinguale în celelalte stadii inclusiv în forma latentă este de asemenea un element util în diagnosticul clinic, deși el trebuie analizat „per exclusionem“ întrucît unele din aceste aspecte apar și în alte infecții ecvine ca : influență, leptospiroză, piosepticemie, meningo-encefalită și strongiloidoză.

Edemele declive cu localizări subtoraco-abdominale, în regiunea furoului și membrelor, prezente în toate formele mai puțin în stadiul supraacut, constituie de asemenea teste de diagnostic clinic dacă sînt analizate în contextul altor simptome și sînt excluse dacă animalul suferă de hemosporidioze (durină, piroplasmoză) sau de insuficiență cardiacă.

Dacă la simptomele manifeste se adaugă aspectele faciesului și atitudinii animalului bolnav, respectiv capul ușor aplecat, fotofobia, astenia, slăbirea și extinderea perimetrului de staționare, se conturează cît de cît imaginea completă a formei clinice de A.I.E., care trebuie totuși diferențiată de boala de Borna și de influența cu care se aseamănă, din acest punct de vedere.

Leziunile anatomice, deși sînt puțin caracteristice pot favoriza totuși unele elemente de diagnostic. Astfel, splenomegalia cu infarcte sau hemoragii subcapsulare este semnificativă pentru diagnostic, dacă se exclude antraxul, piroplasmoză, leptospiroza, piosepticemia și meningo-encefalita; hepatomegalia este de asemenea extrapolabilă la diagnostic dacă se exceptează hepatita virală și toxiinfecția alimentară (trifolioza); limfadenoză, de regulă, generalizată, cu noduli de aspect congestiv, poate constitui un indiciu util în diagnostic dacă se elimină piosepticemia și meningo-encefalita în care prezența acestor noduli este constantă.

Rezultă că simptomele clinice și leziunile anatomice pot constitui elemente semnificative de diagnostic dacă sînt analizate în context și pe un număr mai mare de cazuri, excluzîndu-se infecțiile specifice sau nespecifice cu care sînt uneori superpozabile.

8.3. DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL

Simptomatologia proteiformă și adeseori în continuă modificare, ca și leziunile anatomice puțin caracteristice, constituie adesea elemente echivoce în diagnosticul de certitudine al A.I.E., mai ales în cazuistica unică sau în focarele de infecție primară. În astfel de situații un diagnostic diferențial este imperios necesar atît față de eventualele infecții virale, bacteriene și parazitare, cît și față de unele toxiinfecții alimentare și medicamentoase, maladii supraadăugate etc., care pot îmbrăca o simptomatologie comună.

Infecțiile inframicrobiene ca, arterita virală, hepatita cu virus, exantemul coital, influența, rinopneumonia și pesta ecvină prezintă unele manifestări clinice similare cu A.I.E., sau manifestă elemente de diferențiere legate de rapiditatea evoluției infecției, contagiozitatea extremă și remiterea favorabilă (ex. forma febrilă de pestă ecvină sau forma ușoară de influență).

Diagnosticul diferențial trebuie stabilit inițial din punct de vedere clinic, întrucât fiecare din aceste infecții specifice prezintă particularități de exprimare, ex. arterita virală se manifestă clinic printr-un catar oculo-nazal și edeme corporale; influența se remarcă prin catarul mucoaselor oculo-nazale cu epiforă și jetaj plus o contagiozitate extremă etc.

Pentru toate cazurile așa-zise „la limită” este necesar diagnosticul imunologic, testul I.D.-Coggins fiind pozitiv în A.I.E. și negativ în toate celelalte. Eventualele cazuri fals pozitive constatate în cazurile de rinopneumonie pot fi corectate prin adăugarea la serul cailor suspecti de A.I.E. a serului bovin în proporție de 1/4 așa cum recomandă I m a g a w a și A k i - y a m a (91). Mai dificilă apare situația în cazurile de hepatită virală, supraadăugată pe A.I.E. (302), întrucât serurile icterice ale cailor cu forme grave de A.I.E. induc de regulă rezultate negative în testul I.D.-Coggins¹. Cum prevalența hepatitei cu virus în patologia ecvină se înscrie la cote minime, problema apare ca minoră.

Infecțiile bacteriene, ca leptospiroza, streptococia, salmoneloza, colibaciloza, tuberculoza, bruceloza etc., prezintă unele caractere clinice comune cu A.I.E. (anemie progresivă și mucoase subicterice în leptospiroză și gurmă; adinamie, slăbire progresivă, edeme corporale, în cazurile de tuberculoză și bruceloză). În astfel de cazuri poate fi stabilit în primul rând un diagnostic diferențial clinic față de streptocociile gurmooase care se exprimă prin jetaj albicios-grunjos și adenită submaxilară. Mai dificilă este diferențierea clinică a A.I.E. de leptospiroză (242) — cu deosebire în formele mixte, așa cum s-a constatat în Bulgaria (108) — sau de tuberculoză, bruceloză și colibaciloză, întrucât tabloul clinic al acestora este în unele forme aproape superpozabil. O situație cu totul deosebită o prezintă salmoneloza cu *S. abortus equi* care este izolată curent la caii cu A.I.E. (336). Pentru diagnosticul diferențial în astfel de situații se recurge la examenul paraclinic unic sau în paralel: M.A.L.

¹ A se vedea subcapitolul „Dezavantajele testului I.D.-Coggins (pag. 125).

pentru leptospiroză; I.D.-Coggins pentru A.I.E. Jivo in și col. (110) descriu și fenomenul invers: A.I.E. s-a suprapus pe fondul organic debilitat de gurmă și piosepticemie. Diagnosticul diferențial s-a stabilit „per exclusionem”, respectiv după tratamentul inefficient cu antibiotice și sulfamide.

Infestațiile parazitare hemosporidioze (piroplasmoză, nutalioză, tripanosomiază) sau endoparazitare (strongiloidoză) induc uneori stări anemice marcante și aspecte subicterice ca în A.I.E. Delimitarea diagnostică se realizează fie prin medicații terapeutice corespunzătoare (piroplasmicide, corticosteroizi, antibiotice), fie simplu prin diagnostic imunologic A.I.E. Mai delicată apare situația când A.I.E. se suprapune pe același animal cu una din aceste parazitoze. A fost semnalat și cazul invers, când A.I.E. a creat condiții pentru grefarea pe animalele debilitate a unor hemosporidioze, așa cum a fost nutalioza suprapusă pe cazuri de A.I.E. (243). Diagnosticul diferențial se execută în astfel de cazuri în paralel: hematologic (frotiu) pentru piroplasmoză, nutalioză, tripanosomiază¹; coproscopic, pentru strongiloidoză și serologic (I.D.-Coggins) pentru A.I.E.

Toxiinfecțiile alimentare (trifolioza) sau toxiemiile medicamentoase, induse de medicații antiparazitare (sulfura de carbon, fenotiazina etc.), se manifestă printr-un sindrom anemic acut și tulburări digestive, constatate și în unele cazuri de A.I.E. Diferențierea clinică este dificilă dacă furajele sau medicațiile toxice s-au administrat la un număr restrâns de subiecte și mai ușoară dacă simptomatologia îmbracă un caracter de masă. În astfel de situații se recurge (în afară de tratamentul prompt pentru degajarea tubului digestiv) la testul serologic I.D.-Coggins, care este univoc.

Stările de rău, induse de antigene toxice (veninuri de șerpi) ca și sîngerările masive practicate în institutele de seruri și vaccinuri, realizează adeseori un sindrom anemic similar cu cel din A.I.E. În astfel de cazuri, diagnosticul diferențial prin testul I.D.-Coggins sau „in extremis”, bioproba sînt, de regulă, suverane.

În ultimii 15—20 de ani, arată Ishii și Ishitani (99), dezvoltarea testelor serologice (R.F.C., I.D.) a simplificat mult diagnosticul diferențial, acestea rezolvînd rapid și indubitabil cazurile litigioase.

¹ Pentru tripanosomiază și piroplasmoză se execută concomitent și R.F.C. (45).

8.4. DIAGNOSTIC PARACLINIC

Dacă în A.I.E. investigarea anatomo-clinică nu este întotdeauna concludentă, în schimb examenul de laborator furnizează date certe (300). Cercetarea paraclinică sau de laborator, deosebit de complexă, cuprinde examenele : hematologic, morfopatologic (histopatologic), serologic și biochimic.

8.4.1. PRODUSE PATOLOGICE PENTRU EXAMENUL DE LABORATOR

În vederea efectuării diagnosticului de laborator în A.I.E. se recoltează și trimite la sediul laboratorului de profil, probe de organe (ficat, splină, pulmon; cord, os lung nedeschis, rinichi, ganglioni) proaspete și fixate în formol 10%, frotiuri și probe de sînge (345).

8.4.2. EXAMEN HEMATOLOGIC

Investigarea hematologică exclusivă nu poate constitui o probă concludentă pentru diagnosticul A.I.E. (63 ; 333) ; de asemenea, un examen hematologic efectuat o singură dată nu este suficient avînd în vedere că modificările sangvine se succed și pot fi variabile în decursul evoluției bolii (24). De aceea, B ö h m și col. (24) arată că rezultatele examenului hematologic trebuie repetate și coroborate cu testele clinice și serologice. Deși nici una din anomaliile sangvine nu este patognomonică pentru A.I.E. rezultatele examenului hematologic pot constitui o probă complementară de diagnostic, îndeosebi pentru formele clinice ale bolii, mai puțin pentru formele latente sau pentru perioadele de remisie ale formelor clinice (333), cu condiția să fie examinate în dinamică.

Modificările hematologice care interesează diagnosticul A.I.E. sînt : determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (V.S.H.), siderocitemia, cercetarea corpusculilor lui Heinz, dozarea hemoglobinei, valorile hematocritului, hemograma, trombocitemia și — recent — leucocitoconcentratul (L.C.T.).

Determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (V.S.H.). Inițiată de C e s a r i (36) V.S.H. se bazează pe căderea bruscă a eritrocitelor în hemosedimetre. După F i e l a s și L a r s o n

(65) căderea este bifazică : pozitivă în pirexie și negativă în remisie. Z a k o p o l (332) susține că între V.S.H. și sindromul anemic există o corelație strînsă. J o h n s o n (112) consideră că dintre testele hematologice doar V.S.H. și hematocritul pot furniza elemente certe de diagnostic în A.I.E. Tehnica V.S.H. executată cu hemosedimetre tip Nevodov sau Westergreen arată că această viteză începe să crească în prepirexie valorile ei fiind maxime în pirexie și postpirexie, apoi scăzînd treptat pînă la normal în decurs de 15—20 zile (236). Valorile V.S.H. sînt semnificative cînd în primele 15 minute ajung sau depășesc 50% din coloana de hematii față de 38% în condiții fiziologice. Proba nu este specifică pentru diagnosticul A.I.E. (71), dovadă că V.S.H. este crescut și în streptocociile calului (gurmă) ca și în anemiile induse de hematozoare. Exprimarea V.S.H.-ului poate fi valorificată și ca prognostic : un V.S.H. accelerat (60% în 15 minute) semnifică un proces evolutiv ; dimpotrivă, un V.S.H. moderat (40% în 15 minute) indică un proces infecțios staționar. Excepția o constituie mînji, la care V.S.H.-ul ca și valorile hematocritului sînt total diferite de ale cailor adulți (183).

Siderocitemia¹ indică prezența siderocitelor sau sideroleucocitelor în sîngele animalelor cu A.I.E. Aceasta se explică prin apariția autoanticorpilor calzi care determină degenerarea eritrocitelor, macrofagele acționînd asupra lor, fagocitîndu-le și transformîndu-le fierul eritrocitar, respectiv hemosiderina (95 ; 219).

I s h i i (96) susține că există un paralelism între nivelele siderocitemiei din vena portă, cavă și hemosiderocitemia hepatică. Siderocitele ar fi chiar foarte numeroase în sîngele venei hepatice și venei cave posterioare și mai puțin prezente în sîngele periferic (jugulară) cu excepția perioadelor de acces febril cînd sînt frecvente. Numărul siderocitelor este de regulă proporțional cu intensitatea stressului indus de procesul infecțios. Astfel, în plin acces febril, siderocitele sînt mai frecvente în timp ce eritrocitele scad numeric ; apoi pe măsură ce infecția progresează, siderocitele se reduc treptat cu cît se depărtează de momentul pirexie iar hematiile revin spre valorile normale.

Tehnica de punere în evidență a siderocitelor a fost inițiată și perfecționată de I s h i i (95 ; 96 ; 98) care a utilizat-o în Japonia ca metodă oficială de diagnostic în A.I.E. pînă în anul

¹ Denumirea de sideroleucocite aparține lui I s h i i (95).

1972, cînd a fost înlocuită cu testul I.D.-Coggins. Dacă în Japonia tehnica a putut fi aplicată fără rezerve întrucît țara este indemnă de hemosporidioze, nu același lucru este valabil pentru statele în care piroplasmaza, nutalioza și tripanozomiaza se înregistrează curent.

Cum înainte de 1970 altă tehnică mai corespunzătoare pentru diagnosticul A.I.E. nu exista, siderocitemia a fost practică în diverse laboratoare din lume (255 ; 288), efectuîndu-se totodată diagnosticul diferențial față de hemosporidioze. În România, Sîrbu (269) a preconizat siderocitemia care s-a folosit circa 20 de ani în paralel cu tehnicile clasice de diagnostic a A.I.E. (V.S.H., termometrie, examenul mucoaselor, palparea transrectală a splinei etc.).

Kono, citat de (21) indică următoarea tehnică de evidențiere a siderocitelor : frotiul cu sînge recoltat din jugulară se introduce pentru 10—20 minute într-o baie cu amestec egal de HCl 20% și ferocianură de potasiu 10%. Urmează recolorarea rapidă cu o sol. 0,1% pironină și apoi spălarea cu apă distilată. Frotiul se usucă și se examinează. Leucocitele apar colorate în roșu-roz iar siderocitele în albastru (fig. 18). Rezultatul se consideră pozitiv cînd la 10 000 leucocite se identifică chiar și un singur siderocit. După Rothenbacher și col. (255) rezultatul este pozitiv cînd la 100 000 leucocitele apar 7, iar după Oxe (220), minimum 40 siderocite.

Specificitatea testului siderocitemiei este relativă. Astfel de elemente celulare sangvine (siderocite) s-au constatat în afară de A.I.E. și în hemosporidioze, gurmă, febră peteșială etc. În Brazilia, Vidor (326) susține că testul siderocitemiei a fost pozitiv și în cazul a 27 cai indemni de A.I.E. și de hemosporidioze, prezentînd cu totul alte afecțiuni. Într-o anchetă serologică Fukunga și col. (68) arată că trei cai negativi la testul siderocitemiei au fost pozitivi la testul I.D.-Coggins. Bioproba a confirmat A.I.E. la aceste animale.

Cu toate acestea, testul este util ca examen complementar în diagnosticul A.I.E. De altfel, siderocitemia a constituit alături de testul I.D.-Coggins, baza unei hotărîri judecătorești în Franța unde în anul 1973 a avut loc un proces penal, în care s-a hotărît în final anularea vînzării unei iepe infectate cu virusul A.I.E. (312).

Cercetarea corpusculilor Heinz. Definiți ca granulații mici, rotunde și rare, fixate la marginea interioară a hematiilor, corpusculii Heinz apar de regulă în anemiile hemolitice. Johnson (112) consideră că aceștia reprezintă mai degrabă

simptome de îmbătrânire ale hematiile. Möhlmann (188) susține că sînt formați din concrețiuni de hemoglobină sau stromă celulară rezultată din acțiunea fermentativă la nivelul hematiei după ce virusul și-a început multiplicarea în sînge. Corpusculii apar de regulă în perioada accesului febril sau puțin înainte, după care cresc numeric în cursul procesului infecțios. Numărul lor poate atinge valori de 300 la 1 000 hematii. Prezența lor a fost semnalată în formele acute și cronice de A.I.E. cu deosebire în timpul accesului pirexic (188). Sîrbu și Georgescu (270) stabilesc o corelare strînsă între pirexie, siderocitemie și prezența corpusculilor Heinz.

Tehnica de punere în evidență a corpusculilor Heinz (177) constă în colorarea frotiurilor hematologice cu violet de metil 0,6‰ (dizolvat în ser fiziologic).

Valoarea diagnostică a corpusculilor Heinz este apreciată diferit în funcție de numărul lor raportat la hematii. Astfel Matthias și Unger (173) consideră că 50 corpusculi în 1 000 hematii semnifică o reacție pozitivă a A.I.E.; 30—50‰ indică o reacție suspectă; sub 30‰ nu sînt semnificativi pentru A.I.E.

Goret și col. (71) îi consideră semnificativi pentru diagnostic dacă sînt în proporție de 50—200 în 1 000 din hematiile cailor cu formă acută și 100 în 1 000 hematii la caii cu formă cronică, respectiv 0—11 în 1 000 hematii la caii indemni.

Dozarea hemoglobinei. Este o probă practică mult în țara noastră de specialiști în A.I.E. (110; 237) care utilizează în acest scop hemoglobinometrul Gowers-Sahli. În A.I.E., valorile hemoglobinei coboară sub limita de 40° Sahli (oligocromemie) prin comparație cu 60—80° Sahli cît reprezintă valorile fiziologice (Bercea și col., 1966).

Valori ale hematocritului. Acestea pot furniza o orientare în diagnosticul A.I.E. mai mult decît celelalte probe hematologice (112). Sîngele heparinizat, introdus în dispozitivul Wintrobe, centrifugat 30 minute la 3 000 t/min., permite stabilirea procentajului elementelor figurate sangvine în raport cu volemia. Raportul poate scădea la 20‰ și chiar 13‰ (31) la cabalinele cu sindrom anemic, față de 30—40‰ la subiectele indemne (21). Hallauer (77) susține că la anemocronici, valorile hematocritului pot coborî pînă la 1/4, ceea ce echivalează cu 1 mil. hematii/mm³.

Interpretarea hemogramei. Hemograma în diagnosticul A.I.E. oferă rezultate care sînt diferit apreciate. Astfel, Nicolescu și Giurgiu (206) consideră că examenul morfologic al sîn-

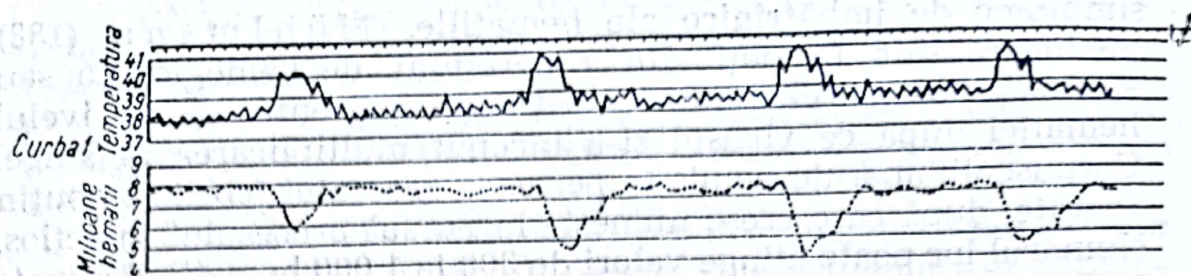


Fig. 19 — Relația dintre febră și anemie într-o formă subacută de A.I.E. (după Ishii, reprod. Goret și col., 1968)

gelui furnizează indicii prețioase în diagnosticul A.I.E., în timp ce Surdan și col. (286) ca și Toma și Goret (301) susțin dimpotrivă că hemograma, leucograma și formula leucocitară nu prezintă interes decât în formele evolutive dar și în acelea, nu întotdeauna.

În cadrul hemogramei interesează în mod deosebit volemia și aprecierea elementelor figurate. Eritrocitele pot diminua numeric înainte, în timpul și după accesul febril (fig. 19) la valori de 5, 4, 2 și chiar 1 milion hematii/mm³ față de 6—9 mil./mm³ valori normale (21). Reducerea numerică a hematiilor la valori atât de scăzute¹ se traduce prin sindromul anemic care nu este specific pentru A.I.E. (258), acesta apărând și în infecțiile septicemice grave de tip colibacilar și chiar în stările subfebrile banale. Anemia prezintă în A.I.E. un caracter toxic, hemolitic și hipocrom (332), fiind pasageră, apărând doar în faza inițială a bolii și în pirexie după care dispare. Morfologia eritocitară suferă unele modificări puțin semnificative: în frotiurile din sângele periferic al cailor cu A.I.E. apar eritrocite cu aspect de anizocitoză mai rar poikilocitoză ca și eritrocite tinere, eritroblaști, megaloblaști, normoblaști, celule de tip iritativ Rieder-Turek cu multe granulații bazofile (152 ; 236) etc.

Leucocitele scad la începutul procesului infecțios în special în decursul accesului febril, ajungând la 4—5 000 elemente/mm³, după care revin la normal (7—11 000/mm³).

Formula leucocitară prezintă modificări nesemnificative (301). Limfocitoza și monocitoza apar în stadiile febrile dar dispar în perioadele de remisie. Când limfocitoza apare și în stadiul tardiv de remisie, constituie de regulă un indicator cert

¹ Scăderea masei eritrocitare la 21,13 ml într-un volum de 107,71 ml sânge/kg corp pentru un cal cu A.I.E. este semnificativă în acest sens dacă este raportat la 40,64 ml masă eritocitară cuprinsă în 102,32 ml/kg corp la calul indemn (163).

pentru diagnosticul A.I.E. (332). Kono și col. (149), studiind dezvoltarea răspunsului limfocitar la caii cu A.I.E. prin măsurarea absorbției de timidină marcată cu tritium în culturile de limfocite, constată că acest răspuns este brusc după infecția primară, descrescând apoi treptat în stadiul de remisie pentru a crește din nou când reapar simptomele clinice. Eozinofilele scad sub limitele normale (2,6—6,2%) în decursul procesului infecțios. Când acestea dispar, semnifică o stare foarte gravă.

Trombocitemia. Scăderea numărului trombocitelor prin lizarea lor pînă la 40 000/mm³ (normal = 150—350 mii) a fost constatată de Nicolescu și Giurgiu (206) în 89% din cazurile de A.I.E., mai ales în timpul și după accesul febril, cu deosebire în formele subacute și cronice. Liza trombocitară este pusă pe seama acțiunii unei enzime care ia naștere în timpul procesului de hemoliză (286). După Iliescu și col. (89) în A.I.E. nu interesează atît numărul redus de trombocite cît mai ales modificările calitative, morfologice (anizocitoză trombocitară, megatrombocitoză etc.), și funcționale ale acestora care stau la baza sindromului hemoragic.

Testul leucocitoconcentratului (I.C.T.). Pornind de la unele constatări (89; 336) care au stabilit că modificările citomorfologice în A.I.E. sînt similare celor leucemice, Manolescu și col. (168) preconizează testul L.C.T. ca metodă de diagnostic în A.I.E. Autorii susțin că L.C.T. constituie un test de diagnostic rapid prin execuție și precoce prin avansarea rezultatelor, comparativ cu testul I.D.-Coggins. La baza L.C.T. stau următoarele motivații: 1. A.I.E. nu a putut fi transmisă experimental de Coggins prin inocularea de eritrocite, plasmă sau amestecul acestora; 2. Virusul A.I.E. replică în leucocite cu deosebire în macrofage și leucocite; 3. Propagarea masivă a virusului are loc în celulele macrofage de tip promonocitar din măduva hematogenă (prezența virusului în celulele histiomonocitare fiind constatată în toate cazurile de A.I.E.); 4. Leucopenia severă din A.I.E. nu permite studiul elementelor din seria albă decît printr-o concentrare a leucocitelor.

Executarea testului este relativ simplă: într-o eprubetă sterilă se introduce 0,05 g E.D.T.A. pulvis peste care se recoltează 15 ml sînge din jugulară. Eprubeta se depune pe stativ unde se menține 30 minute pentru exprimarea serului. Apoi plasma se decantează, iar masa celulară se absoarbe într-o pi-

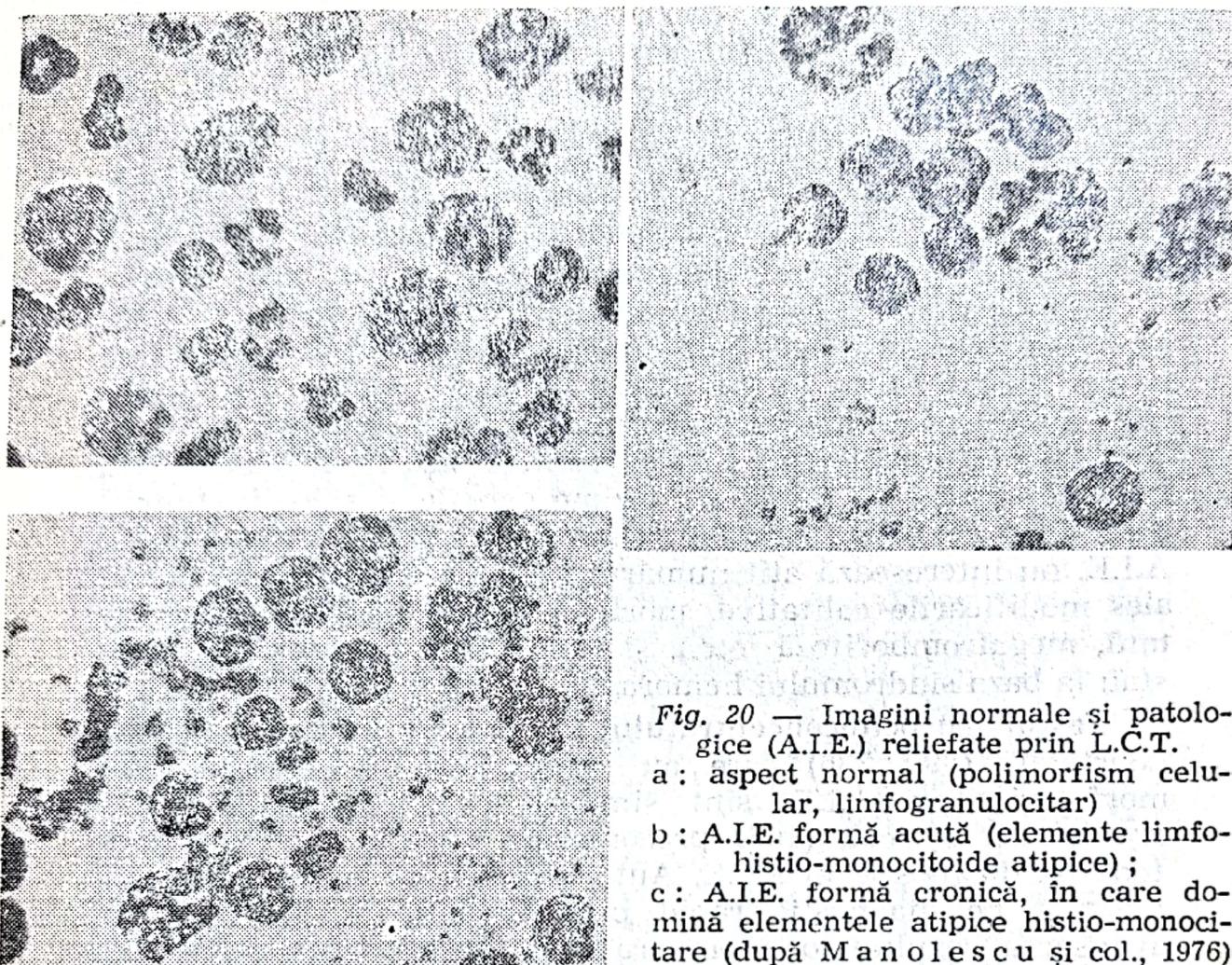


Fig. 20 — Imagini normale și patologice (A.I.E.) reliefate prin L.C.T.

a : aspect normal (polimorfism celular, limfogranulocitar)

b : A.I.E. formă acută (elemente limfohistio-monocitoide atipice) ;

c : A.I.E. formă cronică, în care domină elementele atipice histio-monocitare (după Manolescu și col., 1976)

petă cu bulă și se introduce într-o eprubetă conică de centrifugă. Se centrifughează 10 minute la 1 000 t/min. Supernatantul se decantează, iar din sediment se execută frotiuri care se usucă și colorează după metoda May-Grünwald Giemsa. Frotiul se spală, se imersează pentru clarificare în alcool de 96° și se examinează la microscopul optic cu obiectivul de imersie.

Rezultatele se interpretează astfel : comparativ cu caii indemni (fig. 20 a) la caii cu forma acută de A.I.E., în câmpul microscopic apar elemente reticulo-limfoide de tip blastic, avînd o citoplasmă bazofilă cu un grad avansat de atipie, aspecte de mitoză tipică și atipică, toate acestea în proporție de 15—75% (fig. 22 b). La caii cu formă cronică de A.I.E., aspectele diferă constatîndu-se de regulă o proporție de 25—75% elemente de tip blastic reticular și histomonocitar cu un avansat grad de atipism și mitoze cu caracter net anaplastic (granulopoeza este inhibată ; în schimb apar eritroblaste policromatofile

și oxifile) (fig. 22 c). În nici o altă infecție specifică din patologia ecvină nu apar asemenea modificări hematologice (168), testul fiind considerat specific.

8.4.3. EXAMEN BIOCHIMIC

Deși sînt puțin caracteristice pentru A.I.E., unele valori biochimice pot furniza date complementare în stabilirea diagnosticului (89). Astfel, în A.I.E., valorile colesterolului cresc realizînd hipercolesterolemia (1 g/100 față de normal 85 mg/100 ml ser). Unele enzime (fosfataza, colinesteraza) prezintă modificări constante: fosfataza alcalină depășește adesea valorile normale (4,6—8,5 U Bodansky/ml); colinesteraza prezintă în general o ușoară tendință de scădere față de limitele fiziologice (3,5—8,5 U/ml). Bilirubina crește la toate animalele infectate pînă la 5 mg% (față de 2 mg% la caii indemni), în timp ce probele de disproteinemie sînt marcate de hipoalbuminemie (3,03 g% față de 4,11 g%, normal). Variațiile cantitative ale proteinelor plasmatice rămîn în general nesemnificativ modificate, în timp ce raportul serine/globuline se dovedește constant crescut (albuminele scad pînă la 3% față de 40,9% fiziologic comparativ cu globulinele care depășesc mult limitele normale, cotate la 15,1%).

Proteinograma (electroforeza) serică. Diagnosticul A.I.E. prin electroforeză a fost preconizat de numeroși autori, dintre care amintim pe K a o și col. (115), H e n s o n și col. (82).

Spre a putea aprecia modificările survenite la caii cu A.I.E., T o m a (309) indică valorile proteinogramei la caii indemni (tabelul 4).

În serul cailor infectați, virusul A.I.E. este decelat în fracțiunile albuminică și globulinică de care se pare că nu poate fi separat (265). S-a stabilit că raportul A/G care este sub 0,70% la caii normali (316), scade cu atît mai mult cu cît febra este mai ridicată și mai prelungită iar gravitatea simptomelor, mai accentuată (65). Experimental s-a arătat (82) că scăderea valorii raportului A/G nu rezultă atît din reducerea albuminelor cît din creșterea nivelului gammaglobulinelor. Astfel, s-a stabilit că proporția gammaglobulinelor este 19,35% înaintea infectării virale pentru ca să ajungă la 28,14% după inocularea cu virusul A.I.E. (81). P e a r s o n (223) observă că la solipelele cu forme avansate de boală, la care din cauza leziunilor

Tabelul 4

Valori ale proteinogramei serice la caii indemni

Fracțiuni serice	Valori medii %
Albumine	40,9
Alfa globuline :	15,1
— alfa 1 globuline	3,9
— alfa 2 globuline	11,7
Beta globuline :	19,4
— beta 1 globuline	13,4
— beta 2 globuline	8,9
Gamma globuline	24,7
Raport albumine-globuline, respectiv A/G	$\leq 0,70$

renale, valorile albuminelor cresc, raportul se modifică ajungând la 0,80%.

Proteinograma serică are importanța ei în contextul modificărilor patologice, dar aportul ei în stabilirea diagnosticului A.I.E. s-a redus ca urmare a avansării testelor serologice specifice și rapide (309).

8.4.4. EXAMEN HISTOLOGIC¹

Modificările esențiale care apar în A.I.E. sînt expresiv marcate în parenchimul diverselor organe, S.R.E. și în țesuturile perivascularare, în funcție de forma de exprimare a bolii.

În forma acută și subacută se constată modificări parenchimatose nete, o activare a celulelor reticulo-endoteliale, hemosideroza organelor, proliferări de celule limfoide, hemoragii și edeme (99).

Splina, cu deosebire pulpa, apare hiperemiată și cu conținut hemoragic mai ales în formele acute, pentru ca în stadiul subacut să se remarce o activare a celulelor reticulo-endoteliale și bazofile rotunde, prezente în jurul arterelor centrale și în pulpa splenică. Hemosiderina scade treptat în unele cazuri, iar în altele dispare complet (99).

¹ Date ample privind examenul histologic în A.I.E. sînt prezentate în cap. „Tablou anatomo-histo-patologic” (pag. 68).

Ficatul suferă o degenerescență grasă, cu apariția necrozelor, fără reacție celulară cu prezența de alterări focale incomplete a celulelor hepatice. Este evidentă o infiltrare a celulelor histiocitare din endoteliile sinusoidale și din țesutul perivascular al țecilor lui Glisson (99) care conțin multe granule de hemosiderină. Siderocitele sînt prezentate mai ales în vena centrală hepatică, în sinusoidale și capilare, în care induc adesea blocarea circulației.

Ganglionii limfatici evidențiază la nivelul foliculilor, în sinusuri și țesuturile limfoide din preajma arteriolelor trabeculare, proliferări celulare și prezența histiocitelor și celulelor bazofile rotunde.

Rinichii prezintă depozite de hemosiderină dispuse cu deosebire în glomeruli, precum și degenerarea celulelor epiteliale din circumvoluțiunile tubilor urinari proximali (99).

Măduva osoasă conține hemoragii și hemosideroză, iar numărul mare de celule hematopoetice demonstrează intensă activitate a acestora (338).

În forma cronică se constată proliferarea evidentă a celulelor limfoide și dezvoltarea elementelor argirofile, în special în țesutul reticular și învelișul adventicial vascular (99).

Splina conține cantități infime de hemosiderină depozitată în țesutul parenchimos; în schimb, sînt evidente celule limfoide mai ales în jurul arteriolelor din pulpa organică. Astfel de elemente se surprind în general cînd animalele sînt sacrificate în plin acces febril. Dimpotrivă în remisie predomină fibrele argirofile (99).

Ficatul se remarcă prin dezvoltarea celulelor limfoide care sînt prezente cu deosebire în țecile lui Glisson. Astfel de celule sînt mai puțin reprezentate în formele cronice asimptomatice.

Ganglionii limfatici sînt marcați de prezența celulelor limfoide al căror număr este atît de impresionant, încît domină tabloul patologic prin comparație cu elementele siderinice sărac reprezentate.

Rinichii sînt dominați de celule limfoide — evidente cu deosebire în jurul arteriolelor țesutului interstițial — și de fibre argirofile.

Măduva osoasă este puțin reprezentată de celulele hematopoetice active; în schimb, sînt evidente numeroase celule limfoide (338).

8.4.5. PROBE BIOPSICE

Modificările pe care le suferă singele în decursul acțiunii patogene a virusului A.I.E. sînt consecința leziunilor produse în organele hematopoetice și reticulo-endoteliale, respectiv în ficat, splină și măduva osoasă (90). Aceste modificări au fost demonstrate „in vivo” prin biopsii sau puncții organice, vizînd în final stabilirea diagnosticului etiologic al A.I.E.

Puncția hepatică. Tehnica a fost inițiată de Wall (327) și Lehnert în Suedia fiind practică și recomandată apoi de o serie de autori (82 ; 134 ; 216 ; 283). Isaksson și Jonssen (92) susțin că au executat circa 900 biopsii hepatice la cai cu A.I.E. fără să înregistreze nici un insucces (109). În Iugoslavia, diagnosticul A.I.E. s-a bazat pe rezultatele biopuncției hepatice în perioada anilor 1956—1971, după care a fost oficializat diagnosticul A.I.E. prin testul I.D.-Coggins (232). În România, Jivoiu și col. (109) ca și Iliescu și col. (90) aplică puncția hepatică în diagnosticul A.I.E. considerînd-o în perioada 1959—1960 ca singura specifică (metoda a fost preconizată în afecțiunile hepatice umane de prof. St. P. Nicolaie, Hațegănu și Crăciun) (109).

Recent, ca urmare a introducerii în diagnosticul A.I.E. a testelor serologice, biopuncția hepatică și-a pierdut din valoarea ei diagnostică. Cum testele serologice demonstrează limitele lor, biopsia hepatică nu trebuie total desconsiderată. Utilitatea ei rămîne în vigoare cu deosebire în formele incerte de A.I.E.

În scopul executării biopuncției hepatice, Jivoiu și col. (109) recomandă o sondă-trocar de 20—30 cm lungime și 2—2,5 mm ca diametru. Biopuncția se execută pe animalul în picioare, bine contenționat, locul de elecție fiind al 14-lea spațiu intercostal al flancului drept, pe o linie imaginară dreaptă, care unește unghiul șoldului cu cotul. Inițial se practică în locul stabilit o incizie cutanată de circa 1 cm, după care sonda trocar se introduce cu o mișcare bruscă pe 1/2—2/3 din lungimea ei (în funcție de talia animalului), dirijînd-o ușor spre cotul opus ; se scoate apoi stiletul, iar canula se torsionează de 2—3 ori după care se extrage o dată cu fracțiunea biopsică. Operația poate fi repetată după 10—14 zile.

Fragmentul hepatic extras, fixat în formol 10%, se prelucrează rapid spre a evita pierderea fierului din țesuturile de organe, ca urmare a solvării acestora în soluția de formol (294). În vederea examenului histologic se practică colorarea clasică

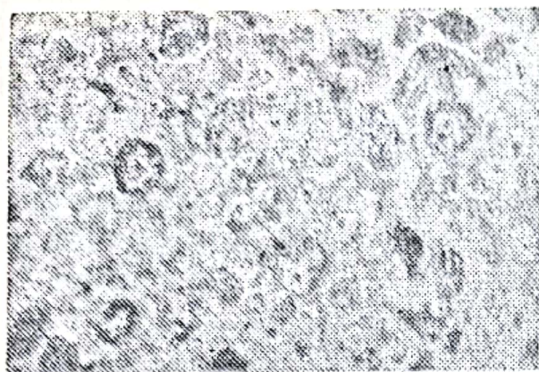
cu hematoxină-eozină, iar pentru detectarea hemosiderozei hepatice se utilizează tehnica Perls.

Jivoin și col. (109) efectuând hepatopuncția pe 53 cai bolnavi, suspecti sau indemni și sacrificând 40 din aceștia spre a confrunța leziunile biopsice cu cele examinate histologic postmortem, constată o concordanță de 100% în 36 cazuri și o discordanță în 4 din acestea. Petrović și col. (229) stabilește într-o situație similară o identitate de 93,15%. Se afirmă (109) că examenul biopsic indică leziuni caracteristice în A.I.E., potrivit stadiului de evoluție al bolii: la 4 zile după infecție apare hipertrofia și proliferarea celulelor S.R.E., aspect care se accentuează progresiv pe măsură ce boala avansează; după 3—9 zile de la declanșarea accesului pirexic este evidentă o necroză a celulelor parenchimotoase din zona centrală a lobului hepatic; depozitarea hemosiderinei în ficat are loc la 5—9 zile după stadiul de debut al bolii; procesul de hialinizare al venei centrolobulare apare mai târziu, menținându-se apoi un timp îndelungat și constituind după Jivoin și col. (109) elementul cert de pozitivitate în diagnosticul intravital al A.I.E.; la sfârșitul celei de a 2-a săptămîni și începutul celei de a 3-a, este evidentă infiltrația celulară limfoidă în întreg parenchimul hepatic.

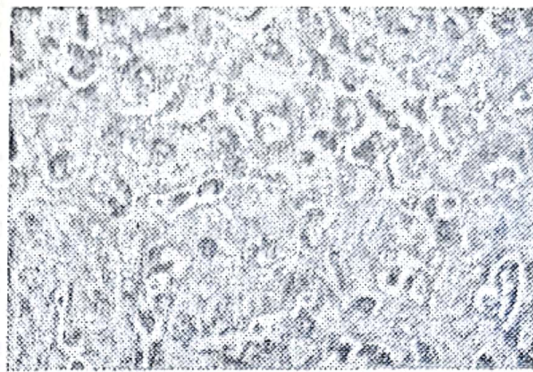
Iliescu și col. (90) susțin că biopuncția hepatică repetată pe același animal oferă posibilitatea studiului leziunilor microscopice în dinamică, de la apariția și dezvoltarea lor progresivă pînă în faza de intensitate maximă. Modificările primare constau în hiperplazia celulelor Kupffer, infiltrațiile limfo-reticulare și nodulii intralobulari sau intrareticulari care disociază septurile hepatice. În celulele reticulare din sinusuri ca și în celulele Kupffer, aflate în diverse faze de mitoză se pot constata frecvent aspecte de eritrofagie accentuată (fig. 21). Sînt evidente, de asemenea, stadii de dezvoltare ale nodulilor hepatici ca și filiația elementelor celulare infiltrative, care provin din celulele reticulare sau endotelio-sinusale, specializate sau nu.

Pinus și col. (234) arată că, practicînd în cinetică tehnica biopuncției hepatice pe același animal, au constatat reversibilitatea histomodificărilor hepatice la caii care au convertit din forma acută în stadiul cronic.

Puncția splenică. Schmidt și col. (258) au preconizat biopsia splenică, sigură și fără riscuri, grație căreia au efectuat 131 puncții din care 15 pe același animal. Tehnica este totuși pretențioasă, astfel că nu este recomandabilă decît în clinici chirurgicale și institute de cercetări. Konno (134) arată că



a



b

Fig. 21 — a : Eritrofagie accentuată în celulele lui Kupffer b : Mitoză în celulele lui Kupffer (după Iliescu și col., 1960)

prezența celulelor rotunde bazofile, avînd o citoplasmă întinsă bine definită, uniform și intens colorată în țesutul splenic, poate constitui un criteriu util de diagnostic. Aceste celule cresc numeric în primul stadiu al infecției și descresc apoi treptat pe măsură ce boala avansează.

Puncția osoasă (stern și ileon). Diverși autori (134; 226) au practicat puncția sternală, extrăgînd și investigînd conținutul medular. Pehl (226) arată astfel că ridicarea gradului de mielopoeză (apreciat la 0,75% la calul indemn) este demonstrată de creșterea numerică a limfocitelor ca și de maturizarea celulelor medulare. Acestea constituie un indiciu în favoarea diagnosticului de A.I.E. Iliescu și col. (90) executînd 113 puncții osoase fără nici un inconvenient, recomandă pentru diagnosticul A.I.E. puncționarea ileonului. Autorii utilizează în acest scop un trocar de 10 cm/Ø 2 mm cu care practică puncția ileonului extrăgînd măduva cu ajutorul unei seringi adaptată la trocar. Din conținutul medular se execută un frotiu care se colorează May-Grünwald-Giemsa și se examinează, apreciîndu-se elementele mielogramei.

Mielograma. Ca urmare a modificărilor patognomice de la nivelul măduvei osoase, mielograma este considerată de Iliescu și col. (90) ca metoda de elecție în diagnosticul A.I.E. Tabloul microstructural este dominat de hiperplazia metaplastică a stromei reticulo-histiocitare ca și de intensitatea ei, care afectează 68,78% din totalul elementelor celulare, față de 6—8% la caii indemnii. Este deosebit de semnificativ polimorfismul acestor celule între care se remarcă celulele reticulare tinere nediferențiate, ca și celulele în curs de diferențiere, celulele reticulare, limfoide, monocitoide, plasmocitare și histiocitare (90; 127).

8.5. DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL (BIOPROBA)

Confirmarea infecției virale A.I.E. se asigură atât „in vitro” prin cultivarea virusului pe linii celulare (leucocite ecvine, măduvă osoasă, celule dermice, celule renale, fibroblaste pulmonare) cât și „in vivo” prin infecția experimentală (bioproba sau proba biologică) a unor animale receptive, cu produse biologice (sînge, ser, emulsie de organe) provenite de la cabaline infectate reproducîndu-se boala experimentală ca în condiții naturale (236).

Koleakov (132) arată că bioproba a fost inițiată în U.R.S.S. de Polkanov (235). Pînă în 1970 cînd Coggins și Norcross (44) au pus la punct testul serologic de diagnostic, bioproba era singura metodă de încredere în diagnosticul A.I.E. Möhlmann (188) arată că rezultatele bioprobei sînt corect exprimate în majoritatea cazurilor de A.I.E., iar Coggins și col. (45) afirmă că sîngele integral de la peste 95% din caii seropozitivi este infectant în bioprobă. În schimb, Surdan și col. (286) susțin că unii cai sînt foarte rezistenți la infecția experimentală, iar sîngele anemolatenților induce de regulă o infecție slab exprimată sau neconcludentă, astfel că bioproba nu diagnostică decît 84,53% din cazuistica A.I.E. Oppermann (217) afirmă că asinul este mai recomandabil pentru bioprobă, fiind întreținut mai economic și demonstrînd o perioadă de incubație mai puțin variabilă (în medie 12 zile). De altfel, în Africa bioproba se execută curent pe asini (9).

Cu toate minusurile ei, bioproba rămîne testul de certitudine în diagnosticul de efectiv, respectiv în cazul în care apar suspiciuni ca urmare a examenului serologic neconcludent sau în situațiile în care s-a efectuat asanarea unui efectiv, iar ulterior au apărut cazuri serologice dubioase. Proba se dovedește utilă de asemenea în cazul animalelor de mare valoare genetică a căror stare de întreținere și sanitară contrastează cu rezultatele serologice pozitive. Popovici și Jivoiu (237) arată astfel că un armăsar P.S. suspectat de A.I.E., controlat termic și hematologic timp de 47 luni, fără rezultate concludente a fost confirmat prin bioprobă. Metoda biologică își găsește de asemenea aplicația în biofabrici unde animalele „dubioase” la testul I.D.-Coggins trebuie clarificate înainte de a fi inoculate. Ea este recomandabilă și în cazul infecției la catiri la care testul I.D.-Coggins este adeseori neconcludent (221).

8.5.1. PARAMETRII METODOLOGICI

Bioproba se execută conform protocolului publicat (342) pe mînji tineri de 9—12 luni, proveniți din zone indemne, sănătoși, care prezintă avantajul față de cei în vîrstă de 6 luni că au depășit etapa tulburărilor digestive, infecțiilor respiratorii și streptococice, manifeste cu deosebire după întărcare. Mînji sînt cazați în boxe speciale perfect închise, cu pereți ecranați, cu geamurile și ușile prevăzute cu plasă de sîrmă, în care sînt menținuți atît în perioada premergătoare inoculării cît și după inoculare, fiind hrăniți și adăpați la timp de un personal îngrijitor conștiincios.

Calea de inoculare a produsului patologic în bioprobă este, de regulă, i.v. și numai rareori s.c. sau i.p.

Doza de inocul¹ este estimată la 50—250 ml sînge integral sau ser defibrinat infectant. Se pot utiliza in extremis și omogenate tisulare provenite de la animalul suspectat, inoculate s.c. sau i.p. Möhlmann (188) recomandă utilizarea dozelor de 10—20 maximum 50 ml sînge sau ser virulent, afirmînd că astfel se evită administrarea concomitentă și a anticorpilor neutralizanți, ceea ce declanșează infecția latentă. Issel și Coggins (103) susțin, dimpotrivă, inocularea cu 250 ml, afirmînd că astfel se injectează mai mult virus liber de celule. Coggins (46) arată că în locul sîngelui sau serului este preferabilă inocularea leucocitelor spălate, în care virusul sau genomul acestuia se găsește sub formă de provirus. Acesta nu poate fi decelat și activat, decît dacă leucocitele sînt spălate și inoculate, atîta vreme cît conțin încă virusul, respectiv în circa 30 minute de la recoltarea sîngelui.

Perioada de incubație în infecția experimentală, estimată în raport cu atît de cantitatea inoculului, cît mai ales de virulența tulpinii și de sensibilitatea animalelor infectate, se apreciază la 4—8 rareori 10—30 și cu totul excepțional 90—100 zile (199). Jivoin și col. (110) estimează perioada de incubație în astfel de infecții între 12—98 zile, iar Kemény și col. (122) la pînă în 30 zile pentru 50% și la peste 100 zile pentru 2,64% din caii infectați².

Ca mod de execuție, bioproba poate fi simplă, de pasaj, de grup și încrucișată.

¹ Doza infectantă minimă (Wyoming) este 1 ml din diluția 10⁻⁶ ser infectant provenit de la un cal aflat în puseu febril. Această doză inoculată s.c. induce accesul febril între 6—30 zile (122).

² De aceea, în pofida recomandărilor de a urmări animalele inoculate numai 60 zile (120 ; 174) mai corectă este observarea lor 90 zile (31).

8.5.2. BIOPROBA SIMPLĂ

Pentru fiecare probă de cal suspect se selecționează doi mînji, în prealabil controlați imunologic. Mînjii urmează a fi inoculați după o perioadă de adaptare și menținere în observație timp de 30 zile. În acest interval, animalele sînt examinate clinic și hematologic, termometrate bicotidian și controlate parazitologic (coproscopic), eventual dehelmintizate.

După injectarea produsului patologic, cabalinele sînt termometrate zilnic și examinate clinic, hematologic și serologic, bilunar.

Bioproba se consideră pozitivă cînd într-un interval de pînă la 90 zile, cel puțin unul din cele două animale febricitază intermitent, exteriorizează simptome clinice de A.I.E. și prezintă modificări hematologice, inclusiv un test serologic pozitiv. Dacă după acest interval nici unul din animalele inoculate nu manifestă simptome clinice, ele sînt injectate cu o suspensie virală de A.I.E., mînjii contractînd de această dată infecția, se infirmă A.I.E. la cabalinele suspectate.

8.5.3. BIOPROBA DE PASAJ

În cazul cailor cu formă latentă de A.I.E. adeseori bioproba este neconcludentă. De aceea, în astfel de cazuri se practică o subinoculare la un nou animal cu sînge de la animalul injectat dar care nu a prezentat o reacție pozitivă. Jivoin și col. (110), ca și K e m e n (120) sugerează acest procedeu denumit bioproba de pasaj. Parametrii de lucru (doză, cale de inoculare etc.), sînt identici cu cei din bioproba simplă. Perioada de incubație este în schimb mai scurtă, respectiv 12—19 zile, iar rezultatele sînt, de regulă, concludente (26).

8.5.4. BIOPROBA DE GRUP

Pentru considerente economice este recomandabilă bioproba de grup. În acest caz se recoltează de la fiecare 2, 5, 10, 20 cai circa 20—30 ml sînge citratat, care se amestecă într-un balon de sticlă. Din volumul total de sînge, jumătate se inoculează la un cal sau mînz și jumătate la altul. Apoi animalele inoculate se urmăresc termic, clinic, hematologic și serologic ca în bioproba simplă, timp de 40 zile (259). Dacă unul din aceste ani-

male prezintă, în decursul intervalului, simptome de A.I.E., fiecare din caii grupului respectiv va fi supus bioprobei simple, astfel identificându-se animalul infectat. K o l e a k o v (133) arată că în U.R.S.S., M u r a t o v efectuînd 106 bioprobe de grup, a identificat starea de purtător la animalele din 9 grupe, 97 fiind declarate indemne.

Caii care după 40 zile nu prezintă simptome clinice, infirmă suspiciunea de A.I.E.

8.5.5. BIOPROBA ÎNCRUCIȘATĂ

R ö h r e r și S t ö h r (252) preconizează bioproba încrucișată, în care întregul lot de cai suspecți de A.I.E. este divizat în grupe de cîte doi. Toți acești cai sînt în prealabil termometrați zilnic timp de 15 zile. Apoi se injectează de la un cal la altul cîte 20 ml sînge citrat, după care animalele sînt menținute în observație, în boxe separate, la adăpostul insectelor hematofage și cu control termic și examen clinic timp de 60 zile (271). Caii care în acest interval prezintă modificări termice și simptome clinice sînt considerați infectați, iar ceilalți sînt declarați indemni de A.I.E. În caz de reacție dubioasă se inoculează sînge de la unul din cei doi cai la un al treilea care se urmărește tot o perioadă de 60 zile. Dacă acest animal nu reacționează, este supus infecției de control. Manifestînd de această dată simptome clinice de A.I.E., rezultă că cei doi cai suspecți de A.I.E. sînt indemni. Acest tip de bioprobă se practică de peste 30 de ani în stațiunile de carantină ale Institutului de vaccinuri din Dessau, care dispune de o crescătorie de sute de cai producători de seruri și care rămîne astfel mereu indemnă de A.I.E., cu toate că se repopulează continuu cu cabaline. Bioproba încrucișată este recomandabilă mai ales în condițiile de asanare a unităților sau hergheliilor, fiind economică și cu un înalt grad de specificitate (188).

8.5.6. INFECȚIA EXPERIMENTALĂ PE ALTE SPECII ANIMALE

În afară de ecvine, infecția experimentală cu virusul A.I.E. a fost încercată pe numeroase alte specii animale.

Porcul, cu deosebire purcelul splenectomizat, a fost considerat la un moment dat ca fiind după ecvine, animalul cel mai

sensibil la această infecție (282). Popovici și col. (236) susțin că virusul A.I.E. se conservă bine în organismul suin timp de 192 zile, iar Tanaka și Sakaki (290) afirmă că în tot acest interval virusul nu se multiplică în sânge și țesuturile suine. Semenov și Oldenburger (264) suspectează de A.I.E. porcii cohabitanți cu caii bolnavi, propunând izolarea porcinelor de solipede infectate ca și interzicerea exportului suinelor cohabitate în scop de reproducție și pentru fabricile de biopreparate. Manolescu și col. (169) folosind testul L.C.T. identifică prezența infecției naturale de A.I.E. la 3 porci care au cohabitat cu caii infectați într-o herghelie în care boala era declarată. Autorii susțin că au detectat prin L.C.T. infecția la 5 porci după 3—5 zile de la inocularea lor cu suspensie de virus A.I.E. Tabloul clinic al porcinelor infectate era dominat de accese febrile și sindrom anemic intermitent.

Oaia și în special mielul au fost considerate mult timp receptive la infecția cu virusul A.I.E. Japonezii Miura și col. (186) au infectat experimental oile reușind să pună în evidență virusul A.I.E. timp de 77 de zile prin inocularea sîngelui lor la mînji. În tot acest interval ovinele nu au exteriorizat boala clinică. Apoi, Miura și col. (186) infectează miei de rasă Merinos cu tulpina de virus Goshun, reproducînd o infecție acută de A.I.E. transmisibilă la mînji prin sîngele recoltat în pirexie. Aceste rezultate nu au fost reproductibile în experiențele de verificare ale lui Kono și Taniguchi (147) deși s-au respectat cu strictețe parametrii experimentali utilizați de predecesori.

Iepurele de casă, inoculat de Oppermann (217) cu suspensie virală A.I.E., a reprodus în serie unele simptome clinice (puseul febril) și modificări morfologice (spleno- și hepatomegalie, cu hemosideroza ficatului și infiltrații celulare diseminate în diferite organe), aidoma celor din tabloul patognomonic al bolii la cal. Trecerea alternativă a produsului viral de pe iepure pe cal a fost realizată și de alți autori (291) care au arătat însă că virusul nu se menține în organismul ecvin decît una-două sau cel mult 5 zile după inocularea transplantului viral. Topolinik și Brudnjak (315) susțin că iepurele sensibilizat prin inocularea prealabilă cu hidroxilamină se pretează la diagnosticul biologic al A.I.E. (29). Unii autori afirmă că iepurele poate fi considerat un model de infecție experimentală cu virusul A.I.E. (118 ; 332), în timp ce alții îi contestă orice valoare de diagnostic (57 ; 67).

Șoarecele alb a fost considerat receptiv la infecția cu virusul A.I.E. de către Dreguss și Lombard (57) care susțin că au reușit pasajul în serie pe șoarece a virusului conținut în broiajul de pulmon, provenit de la un cal infectat, obținând chiar o reducere a patogenității virale. Yamagiwa și col. (335) afirmă că au transmis în serie la fiecare 21 zile, virusul A.I.E. pe șoareci inoculați cu omogenat viral, preparat din ganglioni de cai infectați. Arakawa și col. (6) arată că au reușit izolarea virusului A.I.E. de la șoarecele tinăr, prin trecere pe cal, dar ulterior experiențele lor, reproduse în condiții identice, s-au dovedit infructuoase (117).

Porumbelul a constituit subiectul unor experiențe interesante în infecția cu virusul A.I.E., executate de Oleinik și col. (214). De aceea, după un studiu pe 1 090 cai, autorii propun pentru diagnosticul A.I.E., „testul biologic pe porumbel”. Controlul pe cai receptivi a arătat că testul pe porumbel furnizează 94% rezultate corecte și 6% eronate. Testul, deosebit de laborios, oferă rezultatele abia după 30 zile, respectiv după ce un porumbel este inoculat cu sînge de la calul suspectat de A.I.E., apoi alt porumbel este injectat cu suspensie organică de la primul porumbel, după care în final se execută o reacție de hemaglutinare cu sînge de la ultimul porumbel (188).

Broasca a fost încercată în infecția experimentală pentru diagnosticul biologic A.I.E. Fedotov (62) arată astfel că broasca se pretează la diagnostic ca urmare a modificărilor morfologice eritrocitare după inocularea cu produs conținând virusul A.I.E. Dorogof (56) susține în context că serul cailor cu A.I.E. se dovedește toxic pentru hematiile de broască.

Maimuța, deși exprimă uneori infecția clinică a A.I.E., prin febricitare și deglobulinizare eritocitară reproduce inconstant infecția, astfel că nu a fost acceptată ca model experimental pentru diagnosticul A.I.E. (6).

Alte specii animale. Infecția experimentală cu virusul A.I.E. a mai fost încercată și pe specii ca : boul, capra, cobaiul, șobolanul, găina, vrabia, potîrnichea etc. În total, în cei 75 ani care au trecut de la publicarea lucrării de studiu experimental asupra A.I.E. a lui Vallée și Carré (324) s-au efectuat peste 200 lucrări, inoculîndu-se 26 specii animale domestice și sălbatice (100).

Concluzia finală, formulată de Kono și Taniguchi (147) a fost că, în afară de ecvine, nici o altă specie animală nu se pretează la infecția experimentală cu virusul A.I.E.

8.6. DIAGNOSTIC IMUNOLOGIC

Dintre examenele obiective menite să precizeze diagnosticul A.I.E., detectarea anticorpilor virali (diagnosticul imunologic) prezintă o valoare cu totul deosebită (97). Decelarea acestor anticorpi este facilitată de faptul că la caii infectați, virusul patogen persistă concomitent cu anticorpii precipitanți, fixatori și inhibitori ai complementului, imunofluorescență etc. Cum persistența virală se menține toată viața animalului, iar anticorpii se formează continuu, ca răspuns la stimulul viral, rezultă că ei pot fi identificați în tot acest răstimp.

În scopul stabilirii diagnosticului imunologic al A.I.E. în practică se utilizează următoarele teste: imunodifuzia, reacția fixării complementului și tehnica anticorpilor fluorescenți. Fiecare din aceste metode are valoarea și limitele ei. Dintre ele, imunodifuzia, respectiv testul I.D.-Coggins este considerat specific, sensibil și comod, constituind în prezent baza diagnosticului A.I.E. pentru majoritatea statelor și laboratoarelor din lume (30).

8.6.1. TESTUL DE IMUNODIFUZIE

I. D.-COGGINS

Testul de imunodifuzie I.D.-Coggins poartă firesc numele autorului, fiind cunoscut și înregistrat în laboratoarele de profil din lume ca: test Coggins, test de dublă difuziune în gel de agar, test de imunodifuzie radială, test A.G.I.D.; test G.D.P. (155; 224).

Testul se bazează pe reacția de seroprecipitare dintre antigen reprezentat de extractul viral și anticorpi, recoltați de la un cal infectat.

Primii care au încercat seroprecipitarea în A.I.E. au fost venezuelenii *Saxer* și *Fuentes* (257). Aceștia au utilizat un antigen dintr-un extract pancreatic (provenit de la un cal infectat cu virusul A.I.E., sacrificat în stadiul clinic) iar ca anticorpi, un ser recoltat de la animale bolnave. Rezultatele obținute au fost însă inconstant corecte. *Moore* și col. (189) descriu și ei un test de precipitare efectuat cu ser de iepure (sîngerat în a 14-a zi după inocularea i.v.) și hematii recoltate de la un cal cu A.I.E. în timpul accesului febril. *Livingson* și col. (157) au propus la rîndul lor o tehnică de diagnostic prin precipitare, bazată pe cercetarea precipitinogenului în serul cai-

lor bolnavi cu ajutorul serului hiperimun obținut pe oi inoculate cu virusul A.I.E. (301). N u s b a u m citat de (100) verificând acest test îl găsește nespecific.

În 1970, americanii C o g g i n s și N o r c r o s s (44) publică lucrarea princeps în care fac o descriere științifică a diagnosticului A.I.E., prin testul de imunodifuziune în gel de agar. În acest scop, ei utilizează un antigen constituit din pulpă splenică, provenită de la un ponei infectat experimental cu tulpina Wyoming (cultivată în prealabil 9 zile pe leucocite de cal) și un ser de cal bolnav. Cîteva luni mai tîrziu, japonezii N a j a k i m a și U s h i m i (198) reușesc să prepare un antigen purificat și concentrat, în urma cultivării virusului A.I.E. pe leucocite ecvine. Antigenul leucocitar s-a dovedit a avea aceeași valoare de diagnostic ca și antigenul splenic.

Testul de imunodifuzie (I.D.-Coggins) s-a dovedit a fi specific, virusurile diferitelor infecții virale ecvine ca pestă, rino-pneumonie, influență, exantem coital, infecții herpetice etc., nedemonstrînd nici o relație antigenică cu virusul A.I.E. (20). Metodologia și specificitatea testului au fost ulterior verificate de diferiți autori care l-au găsit util și demn de încredere, totodată aducîndu-i-se o serie de corective menite să îi ridice valoarea de diagnostic (25 ; 72 ; 83 ; 299). Unul din aceste corective îl constituie prepararea antigenului lichid care prezintă avantajul față de cel organic constituit din pulpă splenică (utilizat de C o g g i n s și N o r c r o s s) că poate fi titrat, realizîndu-se astfel o mai precisă dozare a lui în reacție (308).

Între timp s-au formulat aprecieri pozitive la noua tehnică, afirmîndu-se că testul I.D.-Coggins este cel mai exact din medicina umană și veterinară (332). De aceea, O.I.E. (343), Simpozionul de la Varna (344), primul simpozion asupra A.I.E. de la Caracas (346), Congresul mondial de medicină veterinară de la Tessaioniki (347), a 4-a Conferință internațională de patologie infecțioasă ecvină de la Lyon (348) ca și Congresul mondial veterinar de la Moscova (350) l-au recomandat pentru a fi adoptat și utilizat în toate laboratoarele de profil din lume.

În România, testul a fost pus la punct pentru prima dată de C h e l e m e n și col. (39 ; 40 ; 41) care au folosit în acest scop un antigen celular extras din splină de mînz, infectat cu tulpina Wyoming¹. Valoarea acestui antigen a fost confirmată de

¹ Tulpina Wyoming a fost primită de la Ec. Nat. Vét. d'Alfort prin amabilitatea prof. B. T o m a, căruia și pe această cale îi prezentăm grațitudinea noastră.

laboratorul de referință A.I.E. pentru Europa și Africa cu sediul la Alfort (Franța). În 1977 Jivoiu și col. (111) publică lucrarea în care arată că au preparat, tot pe mînji, un antigen valoros. Astfel, antigenul preparat pe mînji a intrat în practica curentă de diagnostic a A.I.E. în întreaga țară, fiind cooptat în producția de serie a I.C.V.B. „Pasteur” din București.

8.6.1.1. BAZA TEORETICĂ ȘI FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ TESTUL

Baza testului I.D.-Coggins o constituie migrarea simultană a antigenului și anticorpului, unul spre altul, printr-un gel de agar și cuplarea lor specifică. În acest caz se formează un precipitat care este înglobat în gelul de bază și produce o linie vizibilă (223).

Reacția poate fi influențată de unii factori fizici, chimici și biologici (223). Linia de precipitare se formează numai cînd antigenul și anticorpul se află în concentrații echivalente, respectiv cînd cei doi reactanți furnizează ceea ce se cheamă un „optimum ratio”. O diferență în plus sau în minus a concentrației unuia din reactanți poate modifica amplasarea liniei de precipitare sau chiar poate anula formarea ei. În practică acest fenomen are loc cînd se utilizează ca sursă de anticorpi un ser hiperimun de cal a cărui zonă de echivalență față de antigenul de lucru se dovedește mult mai strînsă comparativ cu linia indusă de un ser similar de iepure (159). Acesta se prepară astăzi printr-o metodă simplă și sigură servind ca martor în reacție (16). De asemenea, concentrația electrolitului, tamponul și pH-ul ca și temperatura mediului ambiant sînt în măsură să influențeze apariția și formarea liniei de precipitare (223). Temperatura mai ridicată induce o migrare rapidă a reactanților în timp ce la rece se realizează o reacție mai completă, respectiv cu linii mai clar exprimate, mai nete, mai distincte. Modificarea temperaturii în decursul derulării reacției determină formarea de artefacte. De asemenea, concentrațiile mari de lipide, proteine și pigmenți biliari pot afecta formarea liniilor de precipitare (223).

8.6.1.2. INGREDIENTE ȘI ECHIPAMENT DE LUCRU

În execuția testului intră următorii reactanți și ingrediente: antigenul și serul martor pozitiv, serurile de cercetat, tamponul, agarul special sau agaroza, plăcile Petri sau lamele, matrița cu preduceaua și micropipetele.



Antigenul utilizat în reacție reprezintă o suspensie clarificată de splină (223) sau alt organ care se prepară „in vivo” (45 ; 72) prin infectarea animalelor receptive (ponei, cai, minji, asini) cu o tulpină virulentă A.I.E. de import (Wyoming) sau indigenă și sacrificarea acestora după 5—8¹, maximum 9—11 zile de la inoculare, după ce au febricitat două-trei zile peste 40°C (299).

Recoltarea și prelucrarea organelor cu încărcătură virală (splină, ficat, ganglioni etc.), se execută după tehnica descrisă de Coggins și Norcross (44), ca și de Goret și col. (72). Antigenul² poate fi obținut „in vitro” pe culturi de leucocite ecvine (198) sau pe linii celulare dermale ecvine, persistent infectate (164) culturi pe celule renale (148) sau fibroblaste de cal (146).

În practică se folosește antigenul liofilizat sub formă de pulbere roșiatică sau brună, precum și produsul ca atare păstrat la congelator (—30°C). Antigenul liofilizat se recondiționează în momentul lucrului prin solvare în apă distilată după indicațiile din prospect³. Durata medie de utilizare a antigenului în formă liofilizată este de circa 1—1,5 ani (Chelmen, date nepublicate). În acest interval antigenul se titrează periodic întrucât pe parcurs, potențialul său revelator scade.

Antiserul (serul martor pozitiv) de referință, conține anticorpi precipitanți, respectiv precipitine sau IgG care apar în sângele animalelor infectate între 14—45 zile de la infecție (103). Serul se poate obține atât de la caii seropozitivi prin sîngerare și separare a coagulului cît și prin hiperimunizare cu tulpini moderat virulente. Nakajima și col. (203) au obținut serul pozitiv la 97 zile de la apariția primului simptom clinic de A.I.E., iar Coggins și col. (45) la 7 luni de la prima pirexie. Serul se titrează și liofilizează sau se păstrează ca atare la congelator (154), iar la rigoare în frigider (+4°C) timp indefinit (40).

Conform hotărîrii celei de a 4-a Conferințe internaționale de patologie infecțioasă ecvină, care a avut loc la Lyon în 1976 (348), în scopul standardizării reactanților și metologiei de lucru în laboratoarele autorizate, execuția testului se efectuează numai

¹ Antigenele obținute din spline, recoltate de la cai sacrificați mai tîrziu de o săptămînă de la infecție pot fi marcate de anticorpi neutralizanți (45).

² Date ample privind caracteristicile antigenului și modul de preparare al acestuia, sînt prezentate la capitolul „Etiologie”.

³ Antigenul rămas neutilizat se păstrează la congelator sau în extremis la frigider pentru utilizări ulterioare.

cu ser de referință steril inactivat prin căldură și liofilizat conținând un titru minim de anticorp. Un astfel de ser este furnizat la cerere laboratoarelor naționale de către Comitetul de referenți¹.

Serurile de cercetat, conținând anticorpii precipitanți provin de la caii bolnavi clinic sau anemolatenți. Sângele recoltat de la cai în eprubete sterile² este depus pentru exprimare timp de 2—3 ore la termostat (37°C) sau menținut 3—4 ore la temperatura camerei (18—22°C). Serul exprimat se decantează și depune la congelator (—30°C) sau în extremis la frigider (+4°C), până la introducerea lui în lucru. Garanția menținerii nemodificate a nivelului de anticorpi precipitanți în diferite seruri ecvine de-a lungul mai multor ani o constituie menținerea lor la congelator (—30°C). La rigoare, în locul serului clar exprimat poate fi utilizat și sângele hemolizat sau chiar produsul sangvinolent obținut din triturarea și centrifugarea cheagului sangvin extras din cord sau vase de sânge (30).

Tamponul borat se prepară periodic în vederea pregătirii mediului gelozat astfel : într-un balon cotate, steril de 1 000 ml cu dop rodat, se introduc 9 g acid boric chimic pur și 2 g hidroxid de sodiu „in rotulis pro analysi” după care se completează cu apă bidistilată sau distilată până la semnul de cotă. Se lasă balonul pe masa de lucru 2—3 ore pentru solvarea ingredientelor, agitându-se din când în când. Se determină pH-ul conținutului tamponat a cărei valoare va trebui să fie de 8,6. Balonul cu tamponul borat se menține la frigider cel mult 2—3 săptămâni. Rolul tamponului borat este dublu : 1. Realizează un pH optim pentru migrarea reactanților și efectuarea precipitării ; 2. inhibă propagarea bacteriilor și fungilor din plăcile cu agar (223).

¹ Comitetul de referenți este compus din : H. Nakajima, de la Institutul național de sănătate a animalelor, Kodaira, Tokyo, 187 Japonia pentru laboratoarele de profil din Asia și Australia, J. E. Pearson de la Laboratorul serviciului veterinar din Aphis, U.S.D.A. P. P. Box 70 Ames, Iowa 50010 U.S.A. pentru laboratoarele statelor americane, B. Toma de la Ec. Nat. Vet. d'Alfort 94701, Maisons Alfort, Franța pentru laboratoarele din statele europene și africane.

² Unii autori recomandă ca sângele să fie heparinizat (45 ; 319) ; Chelemen (date nepublicate) l-a utilizat recoltat ca atare, iar rezultatele au fost foarte bune.

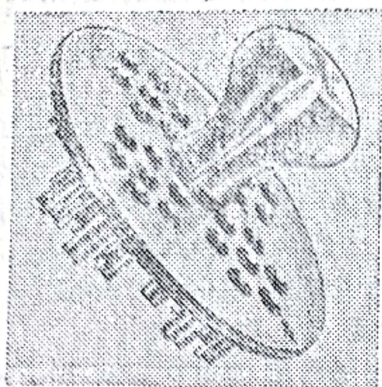


Fig. 22 — Șablon de metal prevăzut cu 4 tuburi pentru ștanțat godeuri în plăci Petri cu Ø 100 mm (după Pearson, 1975)

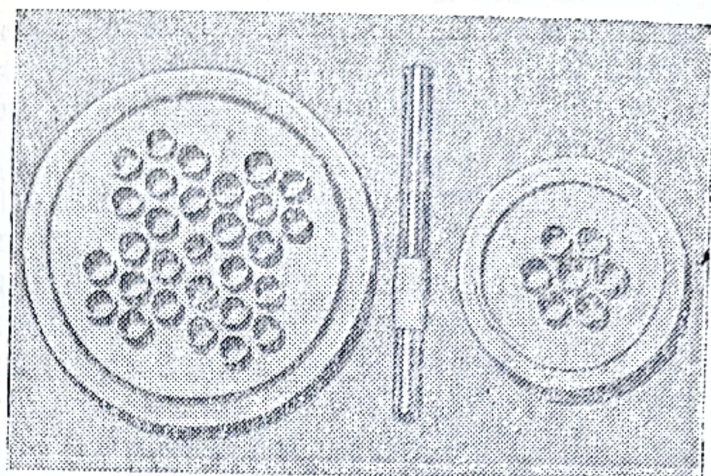


Fig. 23 — Matrițe cu Ø 100 mm și Ø 60 mm, de o parte și de alta a preducelei (după Pearson, 1975)

Agarul, plăcile și matrița. În reacție se folosește de regulă, agaroză sau agarul pur (Noble Agar Difco, Special Agar Noble sau Ion-Agar) în concentrații de 1% și 2%¹.

Fiecare din aceste concentrații se prepara separat în baloane de sticlă termorezistente, adăugându-se la volumul de tampon borat cantitatea de agar corespunzătoare pentru realizarea concentrațiilor prevăzute. Agarul introdus în tampon borat se fierbe pînă la topirea lui completă după care se autoclavează² la 1,5 atm. și 121°C timp de 7 minute (223). Conținutul gelozat se răcește pînă la 45—50° după care se repartizează în recipiente de sticlă în volum de 5 sau 7 ml (agar 2%) și 15, respectiv 17 ml (1%). Recipientele cu conținutul răcit se depun și mențin în frigider 2—3 săptămîni, interval în care agarul poate fi retopit și folosit în reacție.

Agarul retopit în ziua cînd se execută testul se toarnă în plăci Petri cu Ø de 100 mm sau în plăcuțe Ø de 50 mm din polistiren. Plăcile, respectiv plăcuțele, curate, uscate, sterile nu vor conține zgîrieturi pe suprafața capacului inferior. Recent, sînt utilizate cu succes în acest scop plăcile din material plastic cu Ø de 90 mm, incasabile, care se utilizează o singură

¹ B ö h m (23) susține că a obținut rezultate mai bune folosind concentrațiile de agar 0,8% și respectiv 2%.

² Ch e l e m e n (date nepublicate) îl utilizează neautoclavat, cu aceleași bune rezultate.

dată și care comparativ cu plăcile Petri¹, casabile și cu plăcuțele avînd ϕ de 50 mm, sînt mai avantajoase permițînd să se execute 4 rînduri de rozete godeale (1 rozetă = 1+6 godeuri) într-o singură placă.

Godeurile se secționează în agar cu ajutorul unui șablon din metal (fig. 22) sau ebonit prevăzut cu 4 rînduri de tuburi fixate în placă, pentru confecționat cele 1+6 godeuri. În lipsa unui astfel de șablon articulată, poate fi utilizată o matriță simplă confecționată din material plastic, cu ϕ de 90 sau 60 cm și o preducea pentru confecționat godeurile (fig. 23). Diametrul godeurilor este de 7 mm iar distanța dintre ele, de 3 mm².

2.6.1.3. EXECUȚIA PRACTICĂ A TESTULUI

În funcție de numărul serurilor de testat se calculează necesarul în plăci Petri și în tuburi de geloză ; se pregătesc reacțanții și ustensilele pentru turnat agarul. Antigenul și antisera liofilizată se rehidratează conform instrucțiunilor, cu apă distilată, în volumul prevăzut. Plăcile Petri se controlează înainte de lucru spre a nu conține zgîrieturi, așezîndu-le apoi pe masa care trebuie să fie perfect plană (se controlează cu bula de nivel). Agarul 2% topit și răcit la 45° (așa fel ca recipientul de sticlă să poată fi suportat în mîină) se toarnă într-un strat de 1,3 mm, respectiv 5 ml în plăcile cu ϕ de 90 mm și 2 ml în plăcuțele cu ϕ de 50 mm. Plăcile avînd capacele parțial ridicate sînt lăsate pe masa de lucru pentru solidificarea agarului (plăcile conținînd agarul 2% pot fi utilizate în reacție cel puțin două luni dacă sînt menținute într-un container etanș (223) sau circa două săptămîni dacă sînt păstrate la frigider la +4°C (106). Urmează turnarea celui de al doilea strat de agar (1%). Cantitatea de agar care se adaugă este de 15 ml în plăcile cu ϕ de 90 mm și 4 ml în plăcuțele cu ϕ de 50 mm, ceea ce corespunde la o grosime a stratului de agar de 3,9 mm. Plăcile sînt din nou lăsate pe masa de lucru pentru solidificarea celui de al doilea strat, cu capacele întredeschise spre a permite eliminarea vaporilor de apă. Dacă nu pot fi lucrate în aceeași zi, plăcile astfel pregătite pot fi utilizate în reacție timp de 15 zile,

¹ Sterilizarea plăcilor din sticlă se execută în autoclave, iar a celor din material plastic în soluție de formol 2% sau la U.V.

² Dacă astfel de ustensile lipsesc, godeurile pot fi realizate și cu un desen bine conturat (cu tuș sau creion moale) al schemei de lucru așezat sub placa cu orificii godeale.

prin păstrare la $+4^{\circ}\text{C}$. Godeurile se sectionează în agar în intervalul a 1—3 ore de la turnarea celui de al doilea strat de agar (223), cu ajutorul matriței articulate sau simple și a preduceleii. Urmează extragerea dopurilor godeale de geloză din stratul superior (1%) operație care se execută cu atenție astfel ca marginile godeurilor să nu se deformeze sau deterioreze, iar stratul de jos (2%) să nu fie smuls sau atins (223). Pentru extragerea dopurilor de agar din plăci se utilizează un ac de seringă sau o canulă de aceeași dimensiune confecționată din metal sau sticlă avînd un diametru de 5 mm. Canula se utilizează prin adaptare la o pompă de vid sau la un tub de cauciuc corespunzător ca dimensiune și diametru. Eventualele picături de apă sau resturi de geloză din godeuri se absorb cu o pipetă Pasteur. Plăcile cu godeurile astfel confecționate se folosesc în aceeași zi, altfel riscînd ca marginile lor să se deformeze și volumul să se modifice. În locul celui de al doilea strat de agar (1%) Burki și col. (30) aplică un film siliconat, obținînd aceleași bune rezultate, iar Ueda și col. (317), Istrate și col. (104), Chelemen (date nepublicate), folosesc cu succes plăcile Petri cu ϕ de 90 mm în care depun un singur strat de 17 ml agaroză 0,85% sau agar 1%. La rîndul lor Nakajima și Ushimi (198), Ueda și col. (317), Tekerlekov (294) etc., înlocuiesc plăcile Petri cu lame dreptunghiulare de sticlă 26/76 mm pe care depun un singur strat de geloză sau agaroză 0,8% în volum de 4,5 mm și în care confecționează godeuri cu ϕ de 3 mm distanțate la 4 mm (309).

Introducerea reactanților în godeuri se execută cu ajutorul micropipetelor gradate de 0,1 ml sau cu pipete Pasteur bine efilate. În plăcile cu godeuri ϕ de 7 mm, cantitatea reactanților este de 70 microlitri, antigenul fiind depus în godeul central, iar serurile în godeurile periferice. Se realizează astfel o dispunere radială a reactanților de unde denumirea testului de imunodifuzie radială. Modul de dispunere în godeuri a serului martor diferă după autori: Goret și col. (72) îl introduc în două godeuri dispuse față în față (fig. 24, schema 1) în timp ce Pearson și col. (224) îl plasează pe o parte și alta a fiecărui ser de cercetat (figura 24 schema 2). Fiecare din cele două scheme prezintă avantaje și dezavantaje. În timp ce repartizarea serurilor de cercetat în Schema 1 prezintă avantajul că pot fi testate în număr mai mare, respectiv 4 seruri într-o rozetă de 1+6 godeuri, adică 16 seruri într-o placă cu 4 rozete, schema 2 testează doar 3 seruri într-o rozetă, respectiv

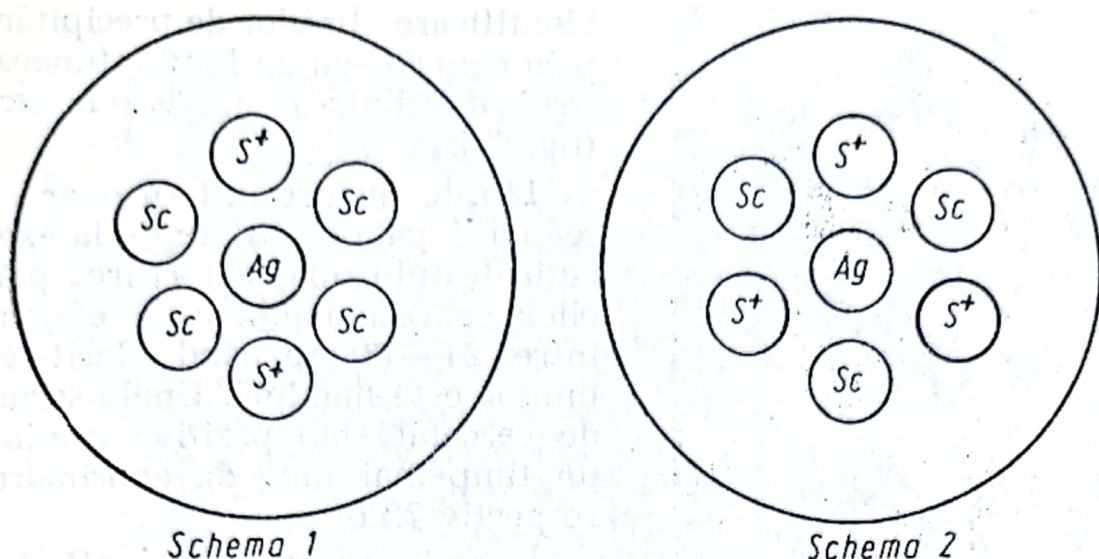


Fig. 24 — Schema de testare 1 și 2 ; Ag=antigen ; S+ ser pozitiv ;
Sc=ser de cercetare

12 seruri în total pe o placă. Schema 1 prezintă unele dificultăți la lectura plăcilor, liniile de precipitare ale serurilor pozitive de cercetat unindu-se numai la un capăt cu liniile serurilor martore, în timp ce dispunerea serurilor conform schemei 2 ușurează determinarea exactă a unei linii de identitate prin coalescența la ambele capete a liniilor de precipitare formate de serul de cercetat cu linia martor, ceea ce sporește sensibilitatea metodei (48).

Introducerea reactanților în godeuri se efectuează cu multă atenție și numai pînă la nivelul superior al acestora, fără a stropi suprafața agarului (106). Plăcile astfel lucrate se mențin în repaus cîteva minute pe masa de lucru spre a evita pierderile prin extravazarea reactanților din godeuri, după care se incubează la temperatura laboratorului (20—25°C) într-un cristalizor, prevăzut cu un strat de vată ușor umectată. Mai practică apare aplicarea pe partea internă a capacului superior al plăcii a unui disc de hîrtie de filtru ușor îmbibat cu apă.

8.6.1.4. CITIREA REZULTATELOR. TIPURI DE REACȚIE

Pentru citirea plăcilor de serodiagnostic este necesară o sursă luminoasă intensă care să traverseze placa cu stratul de geloză de jos în sus. În acest scop, se utilizează un dispozitiv de iluminare cu bec în cameră închisă sau o lampă tubulară fasciculară ale cărei raze traversează placa cu geloză și permit



Fig. 25 — Citirea reacțiilor serologice cu ajutorul unei surse de lumină fasciculară în contrast cu un fond întunecat (după Coggins, 1978).

Identificarea liniilor de precipitare prin contrast cu un fond întunecat realizat dintr-o hîrtie neagră (fig. 25).

Liniile de precipitare apar de regulă după 12—13 ore de la execuția testului (39) dar citirea plăcilor se recomandă a se efectua între 24—48 ore cînd claritatea liniilor este maximă. Unele seruri de cercetat slab pozitive pretind un timp mai lung de exprimare, respectiv 72 ore.

În acțiunea de citire a plăcilor primul element care se urmărește este identificarea liniilor formate între serurile martore și godeurile cu antigen. Dacă aceste linii sînt evidente lectura plăcilor poate continua; dacă dimpotrivă ele sînt absente sau abia vizibile și greu de interpretat, citirea trebuie sistată. În acest caz urmează ca reactanții și ingredientele de lucru să fie verificate. De asemenea, în cazul că liniile martore nu sînt amplasate la jumătatea distanței dintre godeurile cu antigen și antiser înseamnă că reactantul din godeul de care linia este mai apropiată posedă un titru slab și trebuie concentrat și dimpotrivă, cel din godeul opus fiind prea concentrat, se impune a fi diluat. În acest caz este necesară retitrarea reactanților după care testarea serurilor trebuie reluată.

În plăcile cu reacții serologice bine exprimate se constată după (223; 104) următoarele tipuri de reacții:

Reacție negativă. Această reacție este astfel apreciată cînd între godeul cu antigen și ser de cercetat nu se formează nici o linie de precipitare, iar liniile serurilor martor ajung în extensie pînă la marginea godeurilor cu ser negativ (fig. 26).

Reacție slab-pozitivă. O astfel de reacție este exprimată cînd linia serului martor se curbează ușor formînd o buclă sau o cîrje în spre godeul cu antigen și în afara godeului cu ser pozitiv (fig. 27). Uneori, astfel de reacții devin pozitive dacă sînt repetate cu ser recoltat după 8—15 zile (24). Oricum, asemenea reacții trebuie repetate înainte de a fi comunicate rezultatele (300). Serurile slab pozitive pot fi concentrate prin

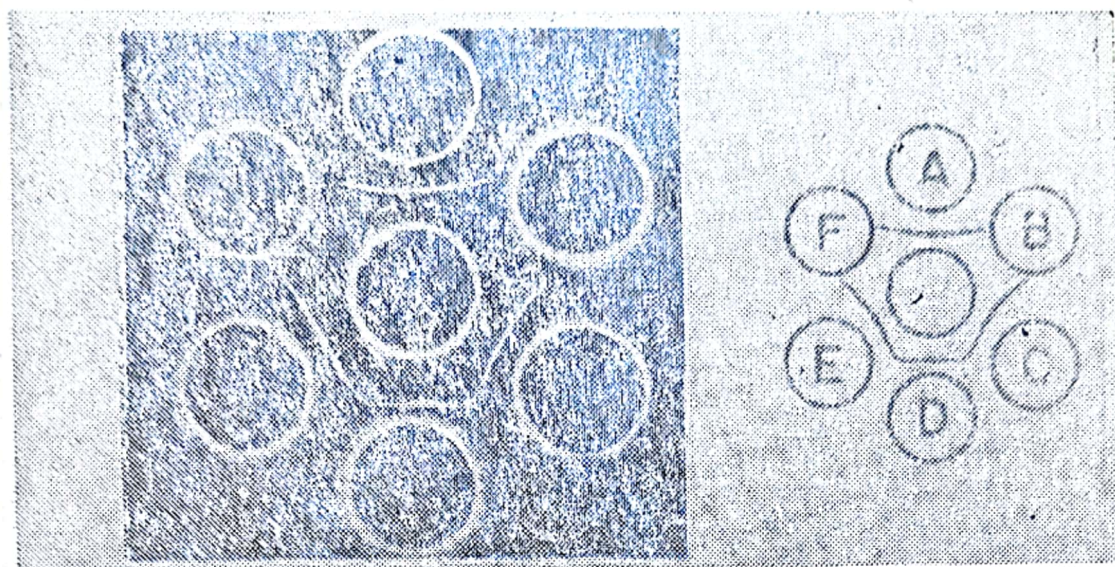


Fig. 26 — Reacție negativă în godeurile B și F (pozitivă în godeul D ;
martor pozitiv în A, C și E) (după Pearson, 1975)

liofilizare și rehidratare în volum redus după care se retestează cu diferite antigene, astfel putându-se obține rezultate mai clare. Alte procedee mai simple : retestarea serurilor slab pozitive cu 3 diluții progresive de antigen sau intercalarea serului slab pozitiv între două probe de ser martor (45).

Reacție pozitivă. Reacția este considerată pozitivă în cazul că între godeul cu antigen și ser de cercetat se formează o linie

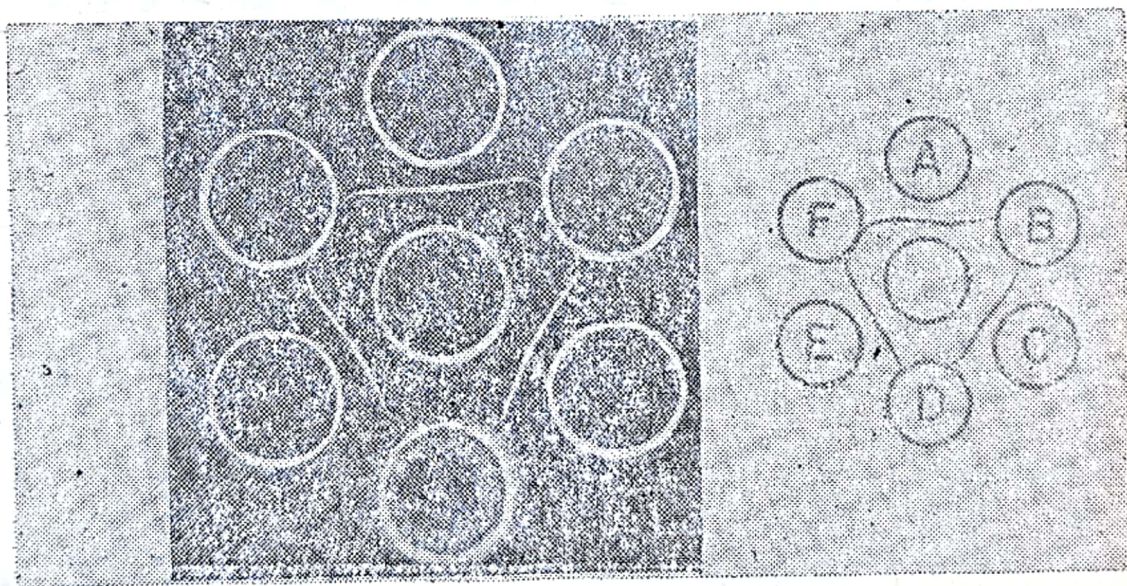


Fig. 27 — Reacția slab-pozitivă în godeul F și foarte slab-pozitivă
în godeurile B și D (martor pozitiv în godeurile A, C și E) (după
Pearson, 1975)

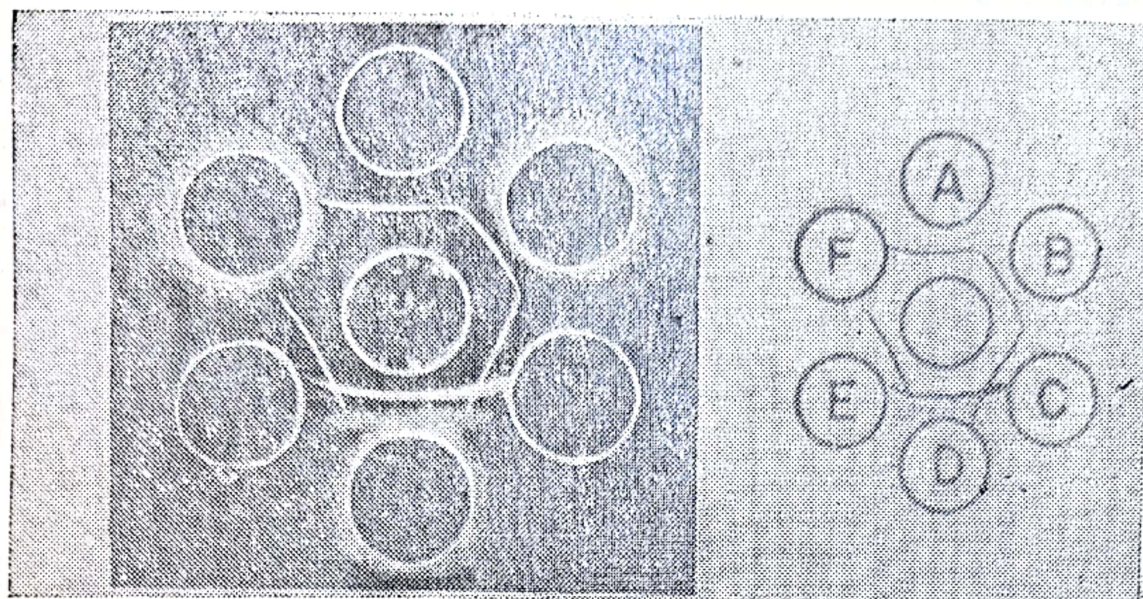


Fig. 28 — Reacție pozitivă în godeul B (negativă în D și F ; nespecifică între D și godeul central ; martor pozitiv în A, C și E) (după Pearson, 1975)

fină, subțire, identică cu cea a serului martor. Această linie se unește la un cap (Schema 1) sau la ambele capete (Schema 2) cu liniile serurilor martor cu care formează un unghi sau un cot (fig. 28). Uneori în reacție pot apare două linii de precipitare mai ales în cazul în care antigenul este proaspăt (Chelmen, observație personală) sau nediluat (111 ; 197). Astfel de linii ale antigenului brut reprezintă cele două fracțiuni anti-

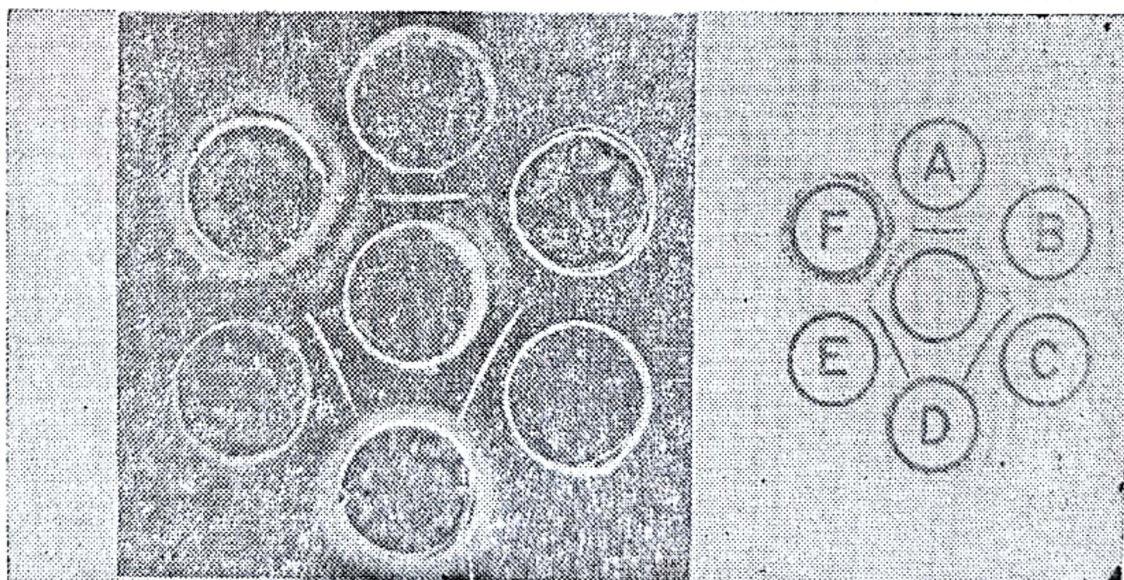


Fig. 29 — Reacție intens pozitivă în godeurile B și F (negativă în D ; parțial mascată în D și F ; martori pozitivi în A, C și E) (după Pearson, 1975)

genice (G și C) care nu împieteză asupra lecturii și interpretării reacției (106).

Reacție intens pozitivă. Este indusă de regulă de serurile cailor cu forme latente ale căror titruri ajung la $1/32$ — $1/64$ (45). În astfel de cazuri, serurile cu exces de anticorpi inhibă partea cea mai apropiată a liniei de precipitare, corespunzând serului de referință vecin (fig. 29). Linia acestor seruri este de obicei mai largă, „cețoasă“ fiind situată mai aproape de godeul cu antigen¹, fapt care se observă mai ales când placa este examinată la 24 ore. O linie mai clară se observă după ce eșantioanele cu ser intens pozitiv au fost supuse diluțiilor binare seriale și apoi retestate, astfel dispărînd „fenomenul de zonă“ (223).

Reacție nespecifică. Liniile care se formează între godeurile cu antigen și serurile de cercetat, intersectînd liniile martore definesc o reacție nespecifică. Liniile martore astfel intersectate se continuă pînă în apropierea godeului cu ser de testat dar linia nespecifică nu se prelungește niciodată cu linia serului martor. De asemenea liniile martore formează întotdeauna un unghi mai ascuțit cu liniile nespecifice prin comparație cu liniile serurilor pozitive (fig. 30). Liniile nespecifice au la bază tot reacția antigen-anticorp, dar oricum în afara cadrului A.I.E.

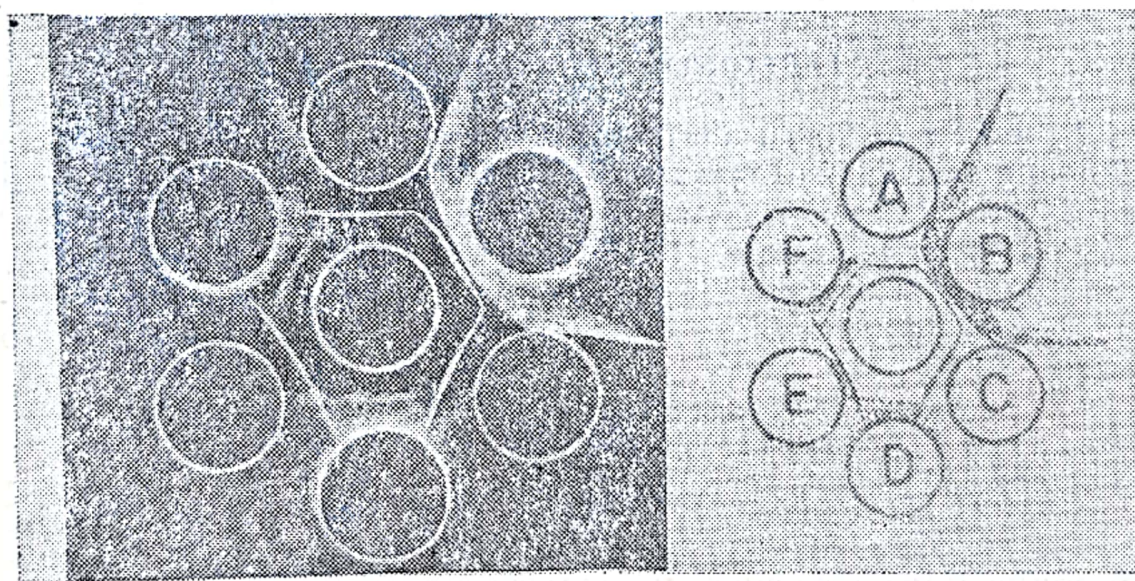


Fig. 30 — Reacții nespecifice în godeurile B și F (pozitivă în B; negativă în D și F; martori pozitivi în A, C și E) (după Pearson, 1975)

¹ Această reacție nu trebuie confundată cu reacția indusă de reactivi slabi inactivați, care produc o linie martor scurtă, extinsă pe distanță egală de fiecare parte a antigenului, dar nu se continuă pînă la godeurile cu ser de testat (223).

Rezultă că un ser de testat poate induce o linie specifică pentru A.I.E. dar și una nespecifică proprie antigenului de organ sau altor antigene. Deci, în reacții pot apare uneori atât linii de precipitare specifice cât și linii suplimentare nespecifice. Dimitrov și col. (53) descriu situația unui lot de 124 cai, din care 72 au prezentat reacții nespecifice. Timp de 14 luni cât au fost observați acești cai, nici unul nu a manifestat simptome clinice de A.I.E. Imagawa și col. (91) constată apariția unor linii nespecifice în reacție la cai care au fost inoculați cu vaccin antiriponpneumonie. Astfel de linii dispar de îndată ce serul ecvin este tratat cu 1/4 ser bovin. Principial, în cazurile când apar astfel de linii, se solicită noi probe serologice, recoltate după 15—30 zile care se retestează sau se expediază laboratorului central de diagnostic.

Reacții mascate. Conținutul lipidic sau proteic excesiv din serurile de testat poate induce în jurul godeurilor așa-zisii „nori de încetșare” care fac dificilă lectura reacțiilor mascând liniile de precipitare (a se vedea fig. 29). Dacă testul se citește la 24 ore, rezultatele pot fi apreciate corect deoarece „ceața” perigodeală se instalează după acest interval. De asemenea, reacțiile mascate dispar dacă serurile respective sînt tratate cu extract de splină normală (44).

8.6.1.5. INREGISTRAREA REZULTATELOR

Schemele de lucru ale testului I.D.-Coggins se desenează cu șabloane în registrul special de evidență pentru examenele de laborator. În acest registru se consemnează toate observațiile privind serurile testate. Rezultatele se înscriu în registre și buletine cu multă atenție spre a evita unele erori umane cu consecințe nedorite (174).

8.6.1.6. INTERPRETAREA ȘI SEMNIFICAȚIA REZULTATELOR

Un test serologic pozitiv semnifică, pentru animalul adult, o infecție certă cu virusul A.I.E., în stadiul clinic sau latent. În majoritatea cazurilor, un cal care este pozitiv la testarea primară rămîne mereu pozitiv (24). Se exceptează mînjii sugari, care posedă anticorpi colostrali. Pentru un mînz neîntărcat, un test pozitiv poate indica totuși și o infecție cu virusul A.I.E. Elucidarea situației este posibilă fie la naștere înainte de primul supt de colostru, cînd un test serologic negativ atestă indemnitătea nou-născutului, iar unul pozitiv certifică infectarea

lui congenitală, fie la finele perioadei de înțarcare când un test negativ confirmă indemnitatea animalului în timp ce o reacție pozitivă stabilește infectarea lui (119). O apreciere asupra neinfectării mînjilor este posibilă și în perioada de alăptare prin testarea în paralel și în dinamică, a serului de la mînz și iapa-mamă. Când serul mînzului indică un titru în creștere al anticorpilor precipitanți, iar al mamei este staționar, aceasta denotă că mînzul deține o producție activă de anticorpi, deci este cu multă probabilitate infectat (153). Dacă iapa-mamă sucombă, iar mînzul este încredințat unei iepe-doici, el poate fi considerat indemn, în cazul că după două luni de la contactul cu mama lui sau cu altă sursă de infecție, nu mai prezintă anticorpi precipitanți (301).

Un test slab pozitiv poate apărea în următoarele situații : a. când animalul se află în perioada de incubație a bolii, caz în care testul poate fi negativ sau slab pozitiv (repetat după 8—10 zile, testul devine de regulă pozitiv (224) ; b. când animalul se află în stadiul de declin al titrului anticorpilor, respectiv se găsește într-o perioadă, care precede faza imunologică negativă (104) ; c. la animalele cu reactivitate imunosupresivă, congenitală sau indusă (104) ; d. la mînji aflate într-o perioadă avansată de eliminare a anticorpilor materni (224). O reacție slab-pozitivă nu prezintă certitudinea indemnității animalului, dar nici nu poate elimina suspiciunea (30). T o m a și col. (299) afirmă că unii cai care la examenul serologic efectuat în luna iunie, au furnizat rezultate slab pozitive sau negative, s-au dovedit în septembrie pozitivi și respectiv dubioși. Z a k o p o l (332) susține că reacțiile slab pozitive sînt dificil de apreciat corect : unele laboratoare le consideră negative, iar altele mai degrabă pozitive. De aceea, în astfel de cazuri se apelează la un laborator central, căruia i se trimit noi probe după 15—30 zile.

Un test serologic negativ indică de regulă absența anticorpilor precipitanți în sîngele animalului testat, respectiv calul este indemn de infecție. Tot libere de infecție se consideră și cabalinele care furnizează un răspuns negativ după două luni de la contactul cu un cal bolnav sau alte surse de infecție. Se exceptează : a. cabalinele aflate în perioada de incubație (174) ; b. caii cu forme icterice grave de A.I.E. ale căror seruri induc reacții fals negative (24) ; c. solipelele aflate în focare enzootice vechi care prezintă titruri variabile uneori sub limita decelabilă prin seroreacție, ca urmare a perioadelor imunologice negative (104) ; d. caii cu infecție de contact, din cauza perioadei de

incubație lungi cînd sînt necesare mai multe determinări pentru elucidarea acestor cazuri (22).

În toate aceste situații se solicită noi probe serologice. Dacă rezultatele nu sînt clare după retestări, inclusiv la laboratorul central, se apelează la laboratorul de referință sau se solicită aprobare pentru executarea bioprobei.

8.6.1.7. VALOAREA REACȚIILOR I.D.-NEGATIVE IN ATESTAREA INDEMNITAȚII DE A.I.E.

Valabilitatea rezultatelor negative ale testului I.D.-Coggins sînt apreciate diferit în funcție de stat, astfel (30) :

S.U.A. consideră valabile rezultatele negative timp de 90 de zile de la recoltarea probelor.

Canada apreciază ca valabile rezultatele negative ale testului timp de 6 luni, indiferent dacă animalul circulă în cadrul statului sau în afara frontierelor.

Statele din Europa consideră valabile rezultatele negative timp de 4 săptămîni.

Austria pretinde pentru caii federațiilor de călărie care circulă în interiorul statului, o valabilitate de 1 an a rezultatelor negative ale testului.

Valori și limite, avantaje și dezavantaje ale testului. Testul este astăzi larg practicat în activitatea de rutină a laboratoarelor de profil pentru confirmarea A.I.E. clinic exprimată, depistarea formelor latente și certificarea indemnitației animalelor care se deplasează în interiorul statului sau în afara frontierelor lui (305). Burki și col. (30) susțin că admiterea de către proprietari a sacrificării animalului infectat, fără a pretinde despăgubiri materiale, este o dovadă a înaltului grad de probitate al acestui test. Autorii testului, Coggins și Norcross (44), i-au atribuit o limită de siguranță de 95% ; ulterior Lamont (153) și Kemmen (120) au susținut că valoarea testului, respectiv specificitatea lui este aproape de 100%. Toma și col. (299) au demonstrat specificitatea testului, prelucrînd 516 seruri provenite de la caii bolnavi sau suspecti de diferite alte afecțiuni ca : influență, gurmă, limfangită, emfizem pulmonar, sinovite, surmenaj etc., din care doar un caz a furnizat o reacție eronată, pozitivă.

¹ Laboratorul de referință pentru statele euro-africane își are sediul la Alfort ; pentru Asia și Oceania, la Tokyo ; pentru America de Nord și de Sud, la Ames, Iowa (S.U.A.) Adresele acestor laboratoare, la pag. 113.

Ca orice metodă serologică, testul I.D.-Coggins prezintă valori și limite, avantaje și dezavantaje.

Avantajele testului :

- testul constituie în prezent singura modalitate disponibilă de diagnostic cert a A.I.E. ;
- testul s-a dovedit a fi specific, rapid și practic ;
- în test pot fi prelucrate cu rezultate foarte bune atât serurile recoltate în condiții de asepsie relativă, hemolizate cât și extrasele de cheaguri sangvine endocardice sau intravascular (30) ;
- testul depistează animalele cronice și anemolamente (formind majoritatea cazuisticii A.I.E.), care înainte nu puteau fi diagnosticate decât prin bioprobă, operație dificilă, oneroasă și de durată ;
- natura lichidă a antigenului și antiserului permit ca reacții să fie titrați, astfel obținându-se rezultate exacte ;
- testul se execută cu aparatură simplă, iar reacții nu periclitizează sănătatea personalului laboratoarelor ;
- un practician exersat poate testa zilnic 450—500 seruri (301).

Dezavantajele testului :

- testul este un indicator inexact al infecției, el detectând anticorpii și nu virusul patogen (73 ; 123) ; anticorpii precipitanți în cazul animalelor adulte corespund prezenței virusului în organism, dar în situația mînjilor sugari pot induce un rezultat fals pozitiv — situații similare ca în pesta porcină, jigodie etc. (120) ; rezultă că testul nu poate diferenția anticorpii pasivi de congenerii lor activi (31) ;
- testul depistează ecvinele cronic infectate și anemolamente dar nu este în măsură să departajeze subiectele potențial infectante de cele inofensive (20) ;
- anticorpii precipitanți sînt de regulă detectabili tîrziu (14—15 zile de la infecție), astfel că animalele aflate în faza de incubație pot induce reacții fals negative (astfel de reacții se pot obține și în stadiul supraacut ca și în cazurile imunologic negative) ;
- serurile icterice provenite de la cai cu forme hepatice grave de A.I.E., furnizează adesea răspunsuri fals negative (24) ;
- la cîțirii infectați, testul este de regulă neconcludent (221) ;
- citirea și interpretarea reacțiilor pretinde multă experiență, unele erori umane nefiind excluse nici în cazul personalului laboratoarelor specializate (332).

Cu privire la nedepartajarea animalelor potențial infectante (cronice și latente) de cele inofensive, în S.U.A. s-au formulat opinii adverse cu referire la aplicarea integrală a testului. Astfel Green (73) susține ca testul să fie aplicat numai la caii suspecți de infecție clinică sau la animalele care au venit în contact cu subiecte clinic bolnave. Knowles (126) afirmă că o parte din anemolatenți nu sînt contagioși, iar McCarron cere ca testul să fie aplicat diferențiat, în funcție de riscul potențial pe care îl reprezintă animalul. Cum o metodă de departajare a acestor grupe de animale infectante și inofensive nu este încă disponibilă (120), toți caii serologic pozitivi trebuie incluși într-un singur grup (174).

Referitor la evitarea unor erori de diagnostic în interpretarea rezultatelor testului, acest aspect trebuie înțeles în spiritul dispoziției O.I.E. (343) privitor la aplicarea testului I.D.-Coggins și în care se arată că :

„Testul Coggins se realizează pe baza unei tehnici standardizate în laboratoare competente și autorizate de Direcția Sanitar-Veterinară a Ministerului Agriculturii din statul respectiv.

În baza unei înțelegeri intervenite între statele interesate se creează centre de serodiagnostic pentru A.I.E., cu tehnicieni specializați, pregătiți în scopul executării corecte a acestui test“.

Venind în sprijinul rezolvării problemei, departamentul de resort din S.U.A. a și inițiat încă la începutul anului 1972 o acțiune de înregistrare a erorilor de diagnostic în laboratoarele destinate să execute acest test. Astfel s-a constatat că media erorilor de diagnostic oscila în limitele a 1,1% pentru laboratoarele profilate din diferite centre ale S.U.A. și 2,6% pentru alte laboratoare din statele americane (225). De aceea, Nakajima și col. (204) au propus la Congresul mondial veterinar de la Moscova (350), o metodă de titrare a antigenului prin imunodifuzie radială simplă, menită să precizeze mai exact titrul antigenului. Pînă la definitivarea standardizării reactanților și metodologiei testului, rămîne valabil punctul de vedere că întrucît din răspunsul la testul I.D.-Coggins pot decurge consecințe deosebite asupra viitorului unui cal, se impune ca execuția testului să fie încredințată unor persoane competente, care să-l realizeze și interpreteze corect, iar cazurile slab pozitive și dubioase să fie retestate sau trimise unui laborator de referință (20 ; 332).

8.6.2. VARIANTE ALE TESTULUI I.D.-COGGINS

8.6.2.1. TESTUL DE MICROIMUNODIFUZIE

Pornind de la considerentul consumului prea mare de reactanți, în special de antigen A.I.E., problemă deosebit de dificilă a laboratoarelor specializate s-a încercat obținerea unor cantități suplimentare de antigen, atât din organele slab reactive ale cailor infectați (metodele Boulanger și Hart-Brossard) cât și prin utilizarea liniilor celulare dermice sau renale ecvine mult mai pretabile la replicarea virală și deci la obținerea unor cantități suplimentare de antigen (tehnicele Malmquist și Kono)¹, precum și prin reducerea cantităților de reactivi în test. Așa cum Toma și col. (300) au preconizat în Franța un microtest de diagnostic, Istrate și col. (104) au inițiat în România testul de microimunodifuzie care utilizează doze de antigen de aproape 3 ori mai mici fără a diminua valoarea rezultatelor.

Principiul metodei. În plăci Petri ϕ 90 mm se depun 17 ml Noble Agar Difco 1% într-un singur strat. După solidificarea gelului de agar se realizează 13 rozete a 1+6 godeuri cu ϕ de 4 mm echidistanțate la 2 mm. Ca și în schema clasică a lui Goret și col. (72), antigenul se introduce în godeul central, iar serurile martore în două godeuri periferice, diametral opuse. În celelalte 4 godeuri laterale se pipetează serurile de cercetat. Într-o placă Petri cu 13 rozete a 1+6 godeuri se testează astfel 52 seruri în loc de 16 câte se examinează prin macrotehnică. De asemenea, cantitățile de reactanți sînt reduse la 25 în loc de 70 microlitri pentru un godeu². Examinarea plăcilor are loc la 24 și 48 ore prin citirea reacțiilor la o sursă de lumină oblică. Rezultatele se dovedesc a fi identice cu cele obținute prin macrotehnică. Un calcul valoric asupra acestei tehnici arată că reactanții și ingredientele utilizate însumează numai 469 lei față de 1 274 lei cât reprezintă costul testării a 100 seruri prin macrogodeuri.

¹ Metodele sînt descrise la capitolul „Etiologie”.

² Pregătirea și execuția microtehnicii nu diferă de macrotehnică decît prin numărul mai mare de godeuri și prin cantitățile mai mici de reacții.

8.6.2.2. TESTUL DE IMUNODIFUZIE-INHIBARE

Testul constituie o modificare a tehnicii I.D.-Coggins concepută de Iurov și Sologub (106) ca și de Celer (35) în ideea demonstrării specificității acestei reacții. Tehnica este deosebit de utilă mai ales în cazul reacțiilor nespecifice, precum și a serurilor provenite de la cai cu infecție cronică la care titrurile de anticorpi sînt adeseori crescute¹. Celer (35) a verificat valoarea acestui test pe 1 100 cai infectați și indemni, obținînd rezultate corecte.

Principiul metodei. Antigenul liofilizat se rehidratează într-un volum de două ori mai mic decît cel prevăzut pentru testarea clasică, respectiv se concentrează de două ori. Din acest conținut se extrag 0,2 ml antigen (Ag+), la care se adăunează 0,2 ml ser de cercetat, pozitiv (S+) sau negativ (S—). Amestecul se menține la temperatura de 18°C timp de două ore în scopul cuplării celor doi reactanți. Pentru a realiza și martorii sau elementele de comparație, Celer pregătește încă două probe : 0,2 ml antigen (Ag+) cu 0,2 ml ser normal (S—) și apoi 0,2 ml antigen din splină normală (Ag—) cu 0,2 ml ser pozitiv (S+). Tuburile conținînd aceste 3 serii de amestecuri se centrifughează 10 minute la 3 000 t/min., după care supernatantele se decantează și folosesc în reacție (tabelul 5).

Tabelul 5

Schema de lucru în reacția de imunodifuzie-inhibare

Supernatantul din cuplul de reacție	Introdus în reacție cu :	Induce rezultatul
Ag+ cu S+	S+ Ag+	Negativ Negativ
Ag+ cu S— ¹	S+	Pozitiv
Ag— ² cu S+	Ag+	Pozitiv

¹ Ser de cal indemn de A.I.E.

² Antigenul este extras din splină normală.

În practică, reacția se execută în plăci Petri cu aceleași dimensiuni și godeuri ca pentru testul I.D.-Coggins, doar că aranjamentul reactanților este altul, iar liniile de precipitare

¹ De aceea, Celer (35) le-a diluat inițial 1/4—1/64 și apoi le-a introdus în reacție.

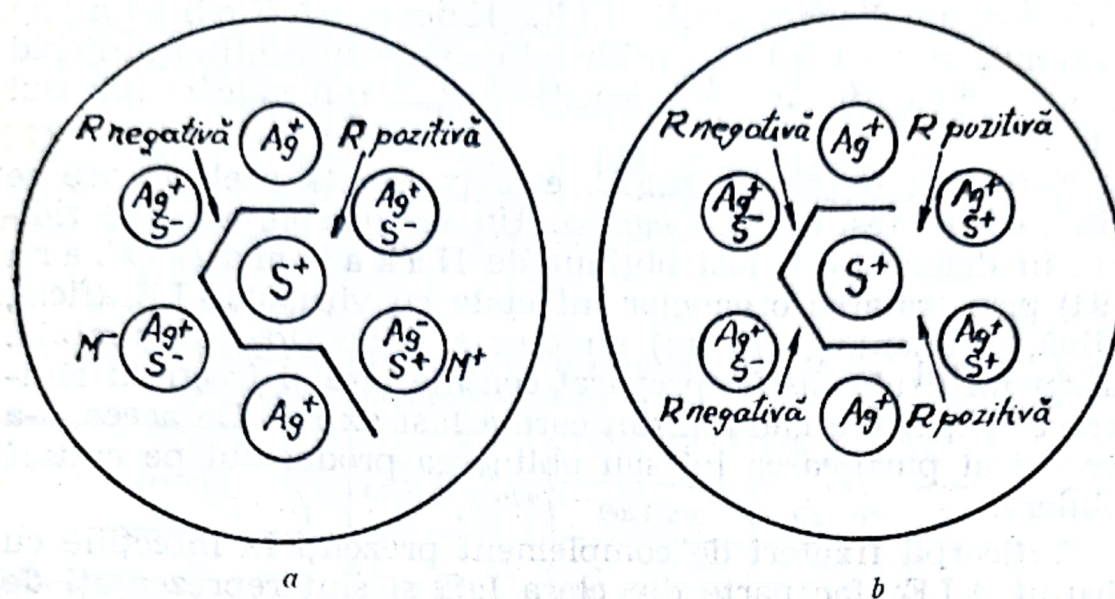


Fig. 31 — a: Schema 1 (după Celer); b: Schema 2 (după Iurov);
 Ag^+ = antigen de lucru ideal; S^+ = ser pozitiv martor; $Ag^- S^+(M)$ = antigen din splină normală, cu ser pozitiv (formind martorul);
 $Ag^+ S^- (M)$ = antigen de lucru cu ser de cal normal (constituind alt martor); $Ag^+ S^+$ antigen de lucru cu ser pozitiv de cercetat; $Ag^+ S^-$ = antigen de lucru cu ser negativ, de cercetare

apar invers. După Celer, experiența testului este mai complexă (fig. 31 a); în schimb, Iurov și Selogub (106) nu consideră necesari martorii pentru această reacție, astfel că metoda lor apare mai simplificată (fig. 31 b).

Fiecare dintre metode, prezintă avantaje și dezavantaje: în timp ce schema lui Celer asigură o specificitate superioară (datorită martorilor din reacție), dar nu poate testa decât două seruri într-o rozetă de 6+1 reactanți, modelul preconizat de Iurov și Selogub eliminând martorii, este în măsură să testeze dublul serurilor în cele 6+1 godeuri cu reactanți, dar limitele lui de siguranță sînt mai reduse.

8.6.3. REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI (R.F.C.) ȘI REACȚIA DE INHIBARE A FIXĂRII COMPLEMENTULUI (R.I.F.C.)

Ishii și Ishitani (99) au constatat că în serul cailor infectați cu virusul A.I.E., există, alături de anticorpii precipitanți și anticorpi fixatori de complement.

În scopul diagnosticării A.I.E., Kono și Kobayashi (136) au conceput R.F.C.¹, utilizînd ca antigen conținutul lichid recoltat din culturile de leucocite de cal, infectate cu virusul A.I.E.

Antigenul folosit în R.F.C. este în esență același care se utilizează în testul I.D.-Coggins. Un antigen cu valoare ridicată în diagnostic a fost obținut de Nakajima și Obara (194) prin tratarea organelor infectate cu virusul A.I.E. (ficat, splină, pulmon, ganglioni) cu eter și hidroxid de aluminiu. Antigenul tisular astfel preparat conține însă și fracțiuni antigenice specifice organului din care a fost extras. De aceea, s-a preconizat purificarea lui sau obținerea produsului pe culturi celulare.

Anticorpii fixatori de complement prezenți în infecțiile cu virusul A.I.E., fac parte din clasa IgG și sînt reprezentați de sensibilizatrice. S-a stabilit că IgG apar și persistă în organism între 17—62 zile după inocularea virusului (136) sau 20—60 zile după accesul pirexic (35). Ca urmare, R.F.C. prezintă dezavantajul aplicării unei perioade de timp limitate în diagnosticul A.I.E., deși ca sensibilitate reacția este superioară testului I.D.-Coggins. Reacția prezintă în plus inconvenientul că, unele din cele 8 imunoglobuline antigenic distincte care apar în serul cailor infectați, fixează complementul, în timp ce altele îl inhibă. S-a stabilit astfel (178) că în serul cailor cu A.I.E., apar atât IgG (anticorpi care fixează) cit și IgG (T)² (anticorpi care inhibă complementul), aceștia din urmă putînd interfera cu cei dintîi (318).

McGuire (181) preluînd tehnica de inhibare a fixării complementului, inițiată de Rice (247) o adaptează pentru diagnosticul A.I.E., utilizînd-o concomitent cu fixarea complementului. Aceasta deoarece R.F.C. este pozitivă cînd domină IgG, iar R.F.C., cînd predomină IgG (T). Deși este relativ laborioasă și utilizată o perioadă scurtă de timp, această tehnică este totuși recomandabilă fiind sensibilă în dozarea anticorpilor, ceea ce este util cu deosebire în cazul infecțiilor experimentale sau în studiul cinetic al focarelor epizootice. Dimitrov și col. (53) au utilizat cu succes R.F.C. într-un focar epi-

¹ R.F.C. este unul din primele teste serologice folosite cu succes în diagnosticul A.I.E. (136).

² IgG(T) = IgG + limfocitele T sensibilizate de virusul A.I.E. și activate imunologic (13).

zootic de A.I.E., cu numeroase forme acute apărute într-un district din Bulgaria, iar Kono și Kobayashi (139) au folosit-o chiar și în cazul diagnosticului formelor subclinice.

Spre a compara valorile testelor de diagnostic serologic I.D.-Coggins și R.F.C., Nakajima și col. (201) controlează în paralel 123 seruri, provenite de la caii suspecti de A.I.E., obținând următoarele rezultate (tabelul 6) :

Tabelul 6

Valoarea comparativă a rezultatelor testului I.D.-Coggins și R.F.C. în diagnosticul A.I.E.

Testul	Numărul total de probe	Rezultate		
		Pozitive	Dubioase	Negative
I.D.-Coggins	123	96 (78%)	4 (3,3%)	23 (18,7%)
R.F.C.	123	24 (19,5%)	10 (8,1%)	89 (72,4%)

S-a stabilit astfel că testul I.D.-Coggins a relevat 78% probe pozitive, față de 19,5% cât a indicat R.F.C. dar acesta din urmă a detectat în plus 5 probe pe care I.D.-Coggins nu le identifica. Rezultă că testul I.D.-Coggins este superior prin specificitatea lui, dar R.F.C. este mai sensibil. Numărul mai mic de seruri pozitive detectate de R.F.C. este explicabil prin dispariția rapidă a sensibilizatricei din circulația sangvină. În plus, R.F.C. poate stabili dacă un caz pozitiv este vechi sau nou, ceea ce testul I.D.-Coggins nu poate realiza. De aceea, este recomandabilă utilizarea în paralel a ambelor teste. În cadrul R.F.C., Kono și Kobayashi (136) au pus la punct și preconizat o microtehnică mult mai simplă ca execuție.

8.6.4. TEHNICA IMUNOFLOURESCENȚEI INDIRECTE (I.F.I.)

Diagnosticul A.I.E. poate fi stabilit rapid prin tehnica I.F.I., fie detectând prezența antigenului (virusului) A.I.E., în țesuturi organice, fie depistând anticorpii specifici din circulația sangvină (114).



Fig. 32 — Reacție de imunofluorescență : detectarea antigenelor în citoplasma celulelor dermice ecvine, cronic infectate cu virusul A.I.E. (după T o m a, 1975)

Identificarea antigenelor A.I.E. fluorescente. Studiul inițiat de T o m a (309) pe linii dermale ecvine infectate cu virusul A.I.E. a arătat că antigenul poate fi pus în evidență după două zile de la inoculare, în circa 50 % din celule (fig. 32).

Cu ajutorul serului de referință Alfort, diluat 1/5, aplicat pe frotiul din culturi celulare, s-a stabilit că antigenul

se localizează exclusiv în citoplasmă și nu în nucleul celular, el fiind dispus perinuclear sub forma unor imagini rotunde sau ovalare. M c G u i r e și col. (178) pun în evidență antigenul în celulele tisulare începînd de la 14 zile după infecția experimentală. Antigenul este localizat cu deosebire în macrofagele și limfocitele din splină (pulpa roșie, mai puțin zona albă), ganglioni (zona medulară și sinusul subcapsular), ficat (celulele Kupffer) și celulele parenchimatoase din pancreas, rinichi, măduva osoasă și timus.

Detectarea anticorpilor anti-A.I.E. fluorescenți. Anticorpul specific detectabil prin imunofluorescență indirectă (I.F.I.) apar în organism simultan cu anticorpul precipitant (311). T o m a (309) constată un paralelism strîns între activitatea precipitinelor anti-G și a anticorpilor depistați prin imunofluorescență indirectă.

Metoda de testare a anticorpilor specifici prin tehnica imunofluorescenței indirecte a fost inițiată de U s h i m i și col. (322 ; 323), C r a w f o r d și col. (50). Astfel, folosind ser pozitiv de la caii infectați cu virusul A.I.E. și ser de iepure anti-gamaglobulină de cal, marcat cu fluoresceină, U s h i m i și col. (322) identifică celulele infectate cu virusul A.I.E., din culturile de leucocite ecvine. Se constată astfel că în culturile inoculate cu virusul A.I.E., celulele cu fluorescență puternică se dezvoltă rapid, ajungînd la 10—15% în ziua a doua de cultivare și la 80% în ziua a 5-a (fig. 33 b), prin comparație cu cele neinfecțate (fig. 33 a) U s h i m i și col. (322), ca și T o m a și G o r e t

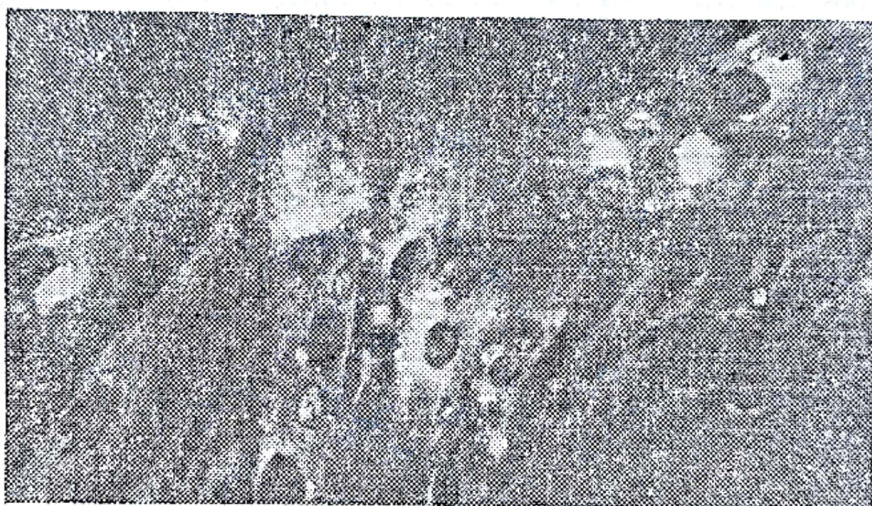


Fig. 33 — Reacție de imunofluorescență :

sus : Celule dermice ecvine cronic infectate cu virusul A.I.E., tratate cu ser liber de anticorpi anti-A.I.E. ; jos : Aceleași celule tratate cu ser conținând anticorpi anti-A.I.E. Se observă distribuția fluorescenței intracitoplasmatică dar nu și în nucleul celular (după T o m a, 1975)

(311) susțin că avantajele tehnicii anticorpilor fluorescenți în diagnosticul A.I.E., prin comparație cu testul I.D.-Coggins, sînt sensibilitatea metodei în detectarea titrurilor scăzute de virus și rapiditatea obținerii rezultatelor (3 ore), dar în munca de rutină, cînd numărul serurilor de cercetat este mare, I.F.I. nu își găsește aplicarea. De asemenea, dacă tehnica este utilă în diagnosticul formelor clinice apoi în stadiile cronice, rezultatele ei nu se dovedesc întotdeauna concludente. M c G u i r e și col. (178) citează astfel situația a 3 cai cu forme cronice de A.I.E., care au prezentat un rezultat negativ la tehnica I.F.I., dar histo-

logic au evidențiat leziuni tipice de A.I.E. Pearson (223) citează chiar cazuri de nespecificitate a I.F.I. în diagnosticul A.I.E.

8.6.5. TESTUL DE SERONEUTRALIZARE

După ce Tokui și col. (298) au demonstrat prezența anticorpilor neutralizanți în sângele cailor cu A.I.E., Kono (138) inițiază testul de seroneutralizare. Testul se bazează pe dozarea anticorpilor serului provenit de la un cal cu A.I.E., față de o suspensie de virus cu titru cunoscut. În acest mod se poate estima valoarea protectoare a unui ser, care conține anticorpi neutralizanți. Kono a stabilit chiar că solipelele care supraviețuiesc infecției cu virus A.I.E., dezvoltă anticorpi neutralizanți, începând din a 40-a zi după infecție. Autorul a mai constatat că 56% din caii infectați posedă astfel de anticorpi pentru o perioadă de timp limitată (40—490 zile), sau pentru toată viața, în timp ce 44% din animale nu induc anticorpi neutralizanți.

Execuția testului. Serul de testat se diluează 1/2 în ser bovin și se inactivează, 30 minute la 56°C, după care se practică diluții seriale cu rația 4 în ser bovin. Apoi, fiecare diluție se adăunează cu un volum egal de suspensie virală A.I.E. conținând $10^{5,0-5,5}$ D.E. 50/0,5 ml. Amestecul este incubat la 38°C pentru două ore, după care se inoculează câte 0,5 ml amestec în 4 eprubete cu cultură de leucocite ecvine. La fiecare eprubetă, conținând amestecul de ser + virus se adaugă 50% ser bovin integral, ca mediu de întreținere. Tuburile cu acest conținut se incubează și examinează la 5 zile în vederea detectării E.C.P.¹ Valoarea testului este apreciată astfel: diluția maximă care inhibă apariția E.C.P. reprezintă titrul anticorpilor neutralizanți pentru proba de testat.

Testul de seroneutralizare este în măsură să stabilească diferențele antigenice, deci să identifice diferite tulpini de virus și chiar variante antigenice în cadrul aceleiași tulpini virale, dezvoltate în decursul procesului infecțios (309).

Dezavantajul testului: nu poate fi aplicat în cazul cailor care nu elaborează anticorpi neutralizanți (22), aceștia cifrându-se la circa 50% (138), iar utilizarea lui în diagnosticul A.I.E., nu este recomandabilă ca urmare a specificității de tulpină și a concentrației reduse de anticorpi (neutralizanți).

¹ E.C.P. = efect citopatic.

8.6.6. ALTE TESTE SEROLOGICE

Sa ū r i n o și col. (256) au inițiat testul de hemaglutinare pasivă și tehnica imunoaderenței cu care au reușit detectarea antigenului în sângele cailor infectați. S e n t s u i și K o n o (265) au preconizat reacția de hemaglutinare (H.A.) și hemaglutino-inhibare (H.A.I.) în care au utilizat ca antigen, lichidul de culturi celulare, recoltat de pe o linie de celule dermale ecvine, cultivate cu virusul A.I.E. La rîndul lor E l - Z e i n și col. (59) obțin succese în diagnosticul A.I.E. prin tehnica de inhibare a interferenței, R a l f și K n o w l e s (244) cu testul imunoaderenței, iar S u g i u r a și N a k a j i m a (284) prin hemaglutinarea pasivă. În 1979 au fost inițiate în scop diagnostic 3 tehnici noi: 1) testarea radioimună preconizată de C o g g i n s și col. (49) deosebit de sensibilă dar cu un ușor rabat la specificitate; 2) metoda imunoenzimatică inițiată de I s s e l și C o g g i n s (103) recomandabilă în diagnosticul A.I.E., pentru cazurile cu titruri slabe de anticorpi; 3) electroforeza în gel prezentată în cadrul celui de al XXI-lea Congres mondial veterinar de la Moscova (350) de către P e t r o v i c și col. (233), care o recomandă ca metodă rapidă și specifică în formele evolutive acute de A.I.E., dar cu rezultate mai puțin precise în cazul serurilor slab pozitive.

Nici una din metodele sus menționate nu s-a impus în practica de diagnostic a A.I.E., fie din cauza complexității metodologiei de lucru, fie ca urmare a unor minusuri de specificitate.

8.6.7. INTERRELAȚIA DIAGNOSTICĂ. EXAMENUL IMUNOLOGIC- MORFOPATOLOGIC

Așa după cum s-a stabilit o interdependență între simptomele clinice și leziunile histologice (283) s-a dovedit că există și o relație între rezultatele examenului imunologic și modificările morfopatologice.

Y a m a m o t o și col. (337) întreprinde în acest scop un studiu pe 123 cai asimptomatici, diagnosticați prin testul sideroleucocitemiei, ca avînd A.I.E. El recoltează probe de ser de la toți caii după care îi sacrifică, constatînd microleziuni de A.I.E. la 94 dintre aceștia. Serurile celor 94 cai sînt testate în paralel prin I.D.-Coggins și R.F.C., rezultatele indicînd 89 seruri pozitive, prin testul I.D. și 28 prin R.F.C. Cum rezultatele histologice

indicau în mod cert A.I.E. la acești cai, se apreciază că testul I.D.-Coggins a fost foarte aproape (94,7%) de rezultatele examenului histologic. Deci, se poate afirma că există o interrelație destul de strinsă între metoda de laborator, histologică și serologică (I.D.-Coggins). O concordanță de 95—96% între aceste tehnici a constatat și R o m b o l i și col. (253) pentru ca C e c a r e l l i și col. (34) să înregistreze chiar o identitate de 100% în cazul a 7 cai asimptomatici clinic dar serologic pozitivi la testul I.D.-Coggins. Rezultate similare a obținut recent în România B a b a și col. (8). Aceștia examinând în paralel probe de la 36 cai din care 20 cu forme subacute, 11 bolnavi cronici și 5 anemolatenți, constată o concordanță de 100% între rezultatele testului I.D.-Coggins și leziunile histologice la cazurile subacute și cronice, dar nu și la formele anemolatențe la care stabilesc că doar 3 animale prezentau leziuni suspecte de A.I.E., în timp ce două nu manifestau nici o modificare morfopatologică. Autorii susțin că cele două cazuri fără leziuni se încadrează în tipul patologic alezional descris de K o n n o și Y a m a m o t o (135) care într-un studiu experimental pe 100 cai infectați au stabilit 7 forme de exprimare a A.I.E. : acut, subacut A, subacut B, cronic inițial¹, cronic propriu-zis, de recădere și alezional.

¹ Caii din tipul cronic inițial au evoluat primar cu formă cronică, în timp ce forma cronică, propriu-zisă include cai cu evoluție cronică secundară, proveniți din forma acută sau subacută (135).

9. PROGNOSTIC

Prognosticul în A.I.E. este în majoritatea cazurilor grav, ca urmare a faptului că în etapa actuală nu este disponibilă nici o metodă de profilaxie specifică și nici o terapie eficientă.

Möhlmann (188) arată că în materie de A.I.E., este riscant să se emită un prognostic favorabil deoarece un cal cu formă acută sau latentă poate sucomba în câteva zile, după cum este în măsură să trăiască luni sau ani fără nici un simptom.

Un prognostic individual și epizootologic poate fi formulat pe baza elementelor obiective, în funcție de examenul paraclinic și de tipul de boală (112).

Prognosticul individual, cu deosebire trebuie corelat cu forma clinică, elementele de gravitate rezultând din :

- intensitatea și rapiditatea apariției și evoluției sindromului anemic (2 mil. eritrocite/mm³ față de 6—7 mil./mm³ la animalele indemne) ;

- scăderea bruscă a numărului de trombocite mici de la valorile normale de 300 000 pînă la valori de 40 000 sau chiar 2 540 elem./mm³ (89) ;

- creșterea intensității bilirubinemiei indirecte pînă la 5 mg⁰/₀ (normal = 2 mg⁰/₀) ;

- apariția unei disproteinemii marcate ca urmare a hipoalbuminei accentuate (albuminele pot scădea pînă la 3% față de 40,9% la caii indemni) ;

- reducerea bruscă a numărului limfocitelor sub 10% (normal = 50,75%) corelată cu dispariția eozinofilelor din singele periferic.

În genere, în formele supraacute ca și în unele cazuri acute, la care accesele pirexice se repetă, prognosticul este de regulă foarte grav ; de asemenea, în formele cronice sau latente, însoțite de recăderi, acesta va fi întotdeauna grav.



10. TRATAMENT

Cu tot numărul impresionant de lucrări, care s-au efectuat în scopul identificării unei medicații terapeutice specifice în A.I.E. deocamdată (ca și în alte viroze) nu este disponibil nici un produs chimic sau antibiotic care să răspundă cerințelor de sterilizare, „in vivo” a agentului patogen (103).

O ameliorare a sindromului anemic se poate obține la caii cu forme clinice de A.I.E. prin administrarea unor medicații conținând : atoxil, tripanblau, neosalvarsan, germanil sau Bayer 205, chinină, arsenic, mercur, bismut, antimoniu, potasiu, fier, calciu, fosfor, iod etc.

Unele din elementele chimice reprezentând oligoelementele (N, K, Na, Ph, Cl, I etc.), deficitare în hrană, dacă sînt administrate cabalinelor cu forme clinice de A.I.E. induc o ameliorare clinică. Masoero (170) recomandă chiar o rețetă conținând astfel de elemente în doze calculate „pro die” și animal¹.

Nici thiouracilul, în care se investiseră atîtea speranțe privind sterilizarea virală și conversia serologică, nu realizează mai mult (349). De asemenea, antibioticele s-au dovedit inefficiente ca urmare a evoluției ciclice a simptomelor A.I.E. (103).

În prezent, în cazuistica clinică A.I.E. se aplică o medicație de susținere și, de la caz la caz, transfuzia sangvină.

Ca medicație de susținere se folosește propionatul de testosteron sau hormonul suprarenal sub formă de acetat de desoxycorticosteron, inoculat i.m. în doze de 100 mg de 5 ori la interval de 48 ore (160). În același sens se pot administra :

— vitamina B₁₂, timp de 3—5 zile în dozele uzuale (5 000 microgamma/zi, asociată cu ser glucozat 500—700 ml/zi) (3) ;

— novalgina, soluție 50% în doze de 30—40 ml, administrată i.v. de 2—3 ori pe zi pînă cînd febra scade, după care doza se reduce la 26 ml/zi încă 1—2 zile (87) ;

¹ Date privind rețeta prof. Masoero sînt redată la pag. 47.

— novalgina + vitamina B₁₂ (în dozele susmenționate) + glucoză + magneziu clorat (în posologia clasică), așa cum recomandă Zeicu (date nepublicate) ;

— transfuzia sangvină în cazurile grave de A.I.E. reușește să reechilibreze în mare măsură animale cu sindrom anemic, dar operația incumbă unele riscuri de transmitere a virusului A.I.E. (233).

Rezultă că în stadiul actual, terapia anti-A.I.E. cu diferitele medicații menționate nu poate duce decât la o remitere clinică a animalelor cu forme acute. Acest fapt poate fi util în măsura în care servește scopului urmărit : recondiționarea animalelor spre a putea fi valorificate prin sacrificare (în statele unde aceasta este legiferată) sau utilizarea în condiții de izolare severă la diferite activități moderate.

Stăruind să se realizeze o viață în condiții de izolare (103).

O amănunțită descriere a modului în care se poate obține la câini cu forme clinice de A.I.E. prin administrarea unor medicamente : novalgine, vitamină B₁₂, glucoză, magneziu sau transfuzii sanguine, este prezentată în lucrarea de doctorat a lui Zeicu (103).

În ceea ce privește elementele chimice în prezenta oligoelementele (Fe, Cu, Zn, Pb, Cd, Li etc.) de care s-a vădit că sunt administrate în formă de săruri, acestea sunt prezentate în lucrarea de doctorat a lui Zeicu (103).

În ceea ce privește elementele chimice care sunt administrate în formă de săruri, acestea sunt prezentate în lucrarea de doctorat a lui Zeicu (103).

În prezent, în cazurile clinice A.I.E. se aplică o medicație de urgență și de la caz la caz, transfuzia sangvină.

Cu toate acestea de sustinere se folosesc preparatul de testosteron sau hormonul suprarrenal sub formă de doxorizon, în doze de 100 mg de 5 ori la intervale de 48 ore (103). În același sens se pot administra :

— vitamina B₁₂, timp de 2-3 zile în doze uzuale (500-1000 mcg/zi), asociată cu ser glimerol (300-500 mcg/zi) (103) ;

— novalgine, soluție 50% în doze de 30-40 ml, administrate de 2-3 ori pe zi până când febra scade, după care doza se reduce la 10 ml/zi în 2-3 zile (103) ;

1. Date privind recepția prof. Masoero la noi, redată la pag. 47.

130

11. PROFILAXIE ȘI COMBATERE

11.1. GENERALITĂȚI

În stadiul actual al cunoștințelor noastre, lupta contra A.I.E. este dificilă, datorită faptului că nu există nici o terapie specifică și nici un produs imunologic eficient (140). În plus, animalele infectate nu pot fi protejate nici prin anticorpi și nici ca urmare a producției moderate sau cu totul insuficiente de interferon (46 ; 253).

Cu toate acestea, lupta contra A.I.E. trebuie dusă învingând dificultățile existente. În acest context trebuie înțeleasă activitatea de profilaxie și combatere.

Primul element care intră în discuție este format de sursa de infecție, constituită de regulă de către animalul infectat (prin animal infectat se înțelege orice cal care a depășit vârsta de 6 luni și prezintă un răspuns pozitiv la testul I.D.-Coggins). Un astfel de animal prezintă, oricare ar fi starea lui clinică, un periculos potențial de fiecare dată, pentru congenerii lui pe tot parcursul vieții. În aceeași măsură, un cal indemn care a venit în contact cu unul infectat nu mai poate fi considerat liber de A.I.E., decât dacă după 60 zile induce un răspuns negativ la testul I.D.-Coggins.

Cel de-al doilea factor, reprezentând agentul transmitător, urmează a fi tratat prin mijloacele chimice, fizice și biologice disponibile pentru ca transportul mecanic de virus de la donator la receptor să fie interceptat și blocat.

Al treilea element, animalul respectiv, urmează a fi protejat prin măsuri riguroase fiind protejat astfel de contactul cu animalele infectate (deosebit de periculoase fiind cele cu forme clinice) sau incerte sub raportul incidențial al A.I.E.

11.2. BAZA SISTEMULUI GENERAL DE PROFILAXIE ȘI COMBATERE

În condițiile în care nu există nici un mijloc disponibil profilactico-terapeutic, măsurile de prevenire și combatere anti-A.I.E. pot îmbrăca doar un caracter coerent și logic de profilaxie sanitară rațională (223).

Principiile generale ale sistemului de profilaxie și combatere ar trebui concepute după modelul canadian (303). În acest sens se impune :

1. păstrarea indemnității efectivelor libere de A.I.E. prin supravegherea clinică și serologică permanentă ;

2. aplicarea unei profilaxii raționale anti-A.I.E. bazată pe o legislație sanitar-veterinară adaptată la condițiile moderne de diagnostic, în care testul I.D.-Coggins să fie recunoscut ca metodă oficială de control ;

3. asanarea efectivelor contaminate prin depistarea și eliminarea animalelor infectate (metoda prin extracție) sau prin măsura radicală (stamping-out).

Într-un articol relativ recent, Coggins (48) dezvoltând aceste principii aplicabile în orice fermă, zonă geografică sau stat, arată că este necesară :

- a. testarea serologică a tuturor efectivelor cabaline și identificarea animalelor seroreagente (pozitive) ;

2. izolarea completă și permanentă, cu sau fără sacrificarea cailor infectați ;

3. controlul imunologic al oricărui cal înainte de a fi introdus într-un efectiv indemn, evitându-se astfel primirea de purtători virali ;

4. combaterea insectelor hematofage și sterilizarea corectă a aparaturii medicale (cu deosebire a instrumentarului) înainte de a fi utilizate, mai ales în condițiile în care purtătorii virali nu sînt sigur eliminați ;

5. separarea mînjilor de iepele-mame sero-pozitive și verificarea lor imunologică la vîrsta de 6 luni, admiterea lor în efective urmînd a fi condiționată de rezultatul negativ al testului serologic.

Aplicarea acestor măsuri de către unele ferme zootehnice a decis hotărîtor ca ele să rămîină indemne de A.I.E., indiferent de situația sanitară a efectivelor din zonele învecinate.

11.3. SISTEME NAȚIONALE DE PROFILAXIE ȘI COMBATERE

La baza profilaxiei anti-A.I.E., majoritatea statelor din lume au legiferat practicarea diagnosticului prin testul I.D.-Coggins. Dacă în 1972 doar 4 state utilizau acest test (Canada, S.U.A., Japonia și Franța), în 1977 numărul acestora ajunsese la 28 (133). În plus, o serie de guverne (R.F.G., Canada, Anglia, Irlanda, Elveția) au adoptat măsura radicală de combatere a bolii; altele (Franța și Anglia) au manifestat o atitudine mai modernă (30). În prezent, sistemele naționale de profilaxie și combatere a A.I.E., diferă în funcție de reglementările de poliție sanitară, specifice fiecărui stat.

Canada poate fi considerată ca jucând rolul de pionerat în aplicarea măsurilor profilactice și de combatere radicală a A.I.E. Testul I.D.-Coggins a fost legiferat în Canada încă în februarie 1971 (26). Legislația canadiană anti-A.I.E. este apreciată ca perfectă și mai cu seamă rațională (303). În Canada orice cal adult care reacționează pozitiv la testul I.D.-Coggins, indiferent că este clinic sănătos sau nu, se consideră infectat cu virusul A.I.E. Caii bolnavi sînt identificați, marcați și sacrificați. Caii infectați (în stare anemolatentă, respectiv serologic pozitivi, purtători virali) sînt fie sacrificați, fie izolați complet și permanent de efectivele indemne, pînă la lichidarea lor. Într-un focar de A.I.E., toți caii cu serologie negativă sînt controlați din nou la 40 zile după primul test, cei găsiți pozitivi fiind prompt izolați. Dacă la a doua testare apar noi cazuri sero-pozitive acestea se izolează în grupul seropozitivilor, iar testarea se repetă la fiecare 40 de zile pînă la identificarea ultimului caz infectat. Pentru caii sacrificați se atribuie o despăgubire materială (26). După îndepărtarea cailor reagenți din adăpostul contaminat se procedează la dezinfecția riguroasă a încăperilor și mobilierului, iar după 40 de zile se execută o retestare a cailor contacti. Dacă rezultatele serologice sînt negative măsurile de carantină se ridică (26). Orice cal importat este controlat în prealabil serologic în țara de origine, nefiind admiși să intre pe teritoriul statului canadian decît cai indemni. Cu aceste măsuri aplicate, în Canada prevalența A.I.E. este în continuă scădere: la un efectiv de 115 000 cai testat în 1971 rata infectivității era de 4,7%; în 1972 ea coboară la 2,9% pentru ca în 1973 să ajungă la 2,3% (26).

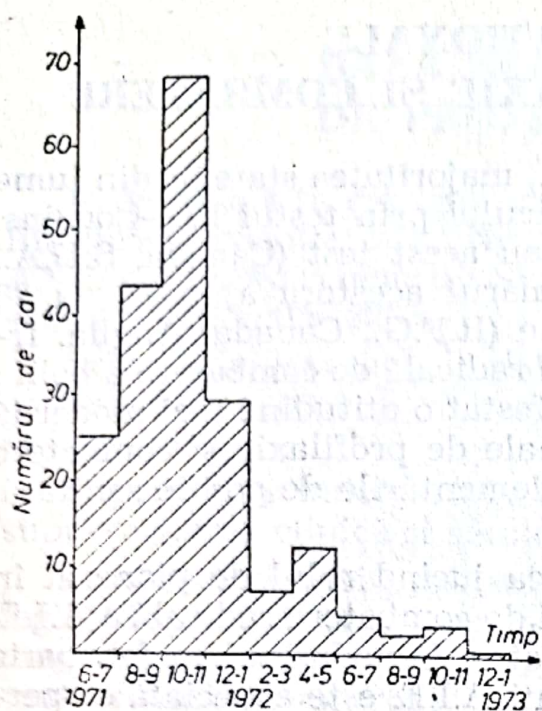


Fig. 34 — După ce din iunie până în decembrie 1971, caii testați în perioade de câte două luni au furnizat progresiv răspunsuri seropozitive fără a se lua măsuri de combatere. Începînd de la finele anului 1971, caii seropozitivi se izolează și elimină, astfel că incidența A.I.E. scade pînă la 0 (zero) la finele anului 1972 (după Toma și col., 1973).

Franta. Ca urmare a mecanizării agriculturii și transporturilor, șeptelul ecvin francez a diminuat vertiginos între anii 1930—1951 de la 20 la 3 milioane capete (295).

În Franța (ca și în Anglia) testul I.D.-Coggins nu este legiferat, iar aplicarea lui se efectuează numai în caz de concordanță a rezultatelor serologice cu simptomatologia clinică. Ca urmare, numai caii cu simptome clinice evidente și serologice pozitive, sînt supuși izolării sau carantinării și sacrificării, după modelul canadian. Această măsură a permis ca în cîteva luni de iarnă să fie lichidat complet un efectiv contaminat care prezenta forme clinice de A.I.E. (fig. 34). Laboratoarele veterinare franceze execută încă din 1971 testul I.D.-Coggins pe tot cuprinsul statului, dar organele de decizie îl aplică diferențiat. În judecarea cazurilor litigioase, organele de justiție fac uz de testul I.D.-Coggins cît și de rezultatele sideroleucocitemiei (313).

Elveția. Diferențele de incidență zonală a A.I.E. sînt influențate de variațiile pedo-climatice și de circulația insectelor hematofage cu deosebire a țînțarului Mosquito, considerat vectorul nr. 1 al A.I.E. în Elveția. Ca urmare a climei și reliefului din Elveția o serie de cazuri și focare enzootice de A.I.E., au dispărut fără intervenția organelor sanitare-veterinare. Zonele cu altitudine de peste 800 m sînt prin definiție indemne de A.I.E., ca urmare a absenței circulației insectelor, respectiv țînțarului vector al virusului A.I.E. (275). În Elveția, cazurile serologic pozitive sînt rezolvate prin măsura radicală, indiferent de forma evolutivă a A.I.E. (30).

Prevalența A.I.E. în Franța anului 1973, înregistra 34 focare enzootice (302). O anchetă serologică întreprinsă de Tom a și col. (302) stabilea că cele mai infectate zone din Franța erau situate în nord-estul țării (departamentele Meuse, Haute Marne, Vosges, Pie Saône Geidort etc.), de unde A.I.E., a difuzat treptat spre centrul statului, o serie de efective aflându-se ulterior în situația de incertitudine sub raportul indemnității de A.I.E. (departamentele Calvados, Ardeche, Rhône, Cher, Orne etc.).

Măsurile de carantină se ridică după două luni de la moartea (uciderea) ultimului caz de A.I.E. clinică (350).

R. F. Germania. Până în 1950 în R. F. Germania au acționat prevederi legale infructuoase în privința prevenirii și combaterii A.I.E. (112 ; 250). Între 1950—1972 se consemnează un declin al prevalenței A.I.E., datorat mai ales reducerii efectivelor ecvine pe seama mecanizării agriculturii și transporturilor (205). Astfel, în 1950 s-a raportat un număr de 300 de puncte infectate cu virusul A.I.E. ; în 1960 numărul acestora scade la 72, pentru ca în 1966 să se înregistreze numai 7 puncte, iar în 1974 doar 3 (22). Zonele mai contaminate erau Kassel și Marburg (172). Testul I.D.-Coggins a fost recunoscut oficial în 1973. Anchete serologice întreprinse între 1973—1979 pe 12 000 cazuri constată o incidență sporită a A.I.E. în sudul R. F. Germania, unde clima este mai favorabilă circulației insectelor vectoare (172). Indicii de prevalență A.I.E. indicau în 1975 o rată de 1,5% pentru caii indigeni și 7,9% pentru caii de import (20). Măsurile de combatere constau în : identificarea cailor infectați, izolarea și abatajul acestora (30 ; 250). Măsurile sanitare veterinare se ridică după o testare serologică cu rezultate negative : prima la 3 săptămâni, a doua la alte 4 săptămâni de la ultimul cal mort (ucis) de A.I.E. (24).

Japonia. Niponii consideră că A.I.E. este boala cea mai gravă și cu cele mai mari pierderi economice în șeptelul național (96). Boala a fost importată în Japonia din America în anul 1889 când s-au adus din California cai de reproducție de mare valoare genetică (96). Din aceștia, o parte s-a îmbolnăvit și a sucombat cu simptome și leziuni de A.I.E. Insectele hematofage și climatul umed favorizează propagarea infecției, compromițând adeseori efectivele ecvine și creind mari pagube proprietarilor de cai (288). Urmare a pierderilor mari în efectivele ecvine, în 1905 a luat ființă Comitetul temporar pentru investigarea A.I.E. iar între 1910—1914 și-a desfășurat activitatea Comisia japoneză de cercetare a A.I.E. Astfel a început în Japonia

studiul temeinic și metodologic al acestei boli. Școala japoneză are meritul de a fi reușit realizări de marcă în problema cunoașterii caracterelor fizico-chimice, patologice și imunologice ale virusului A.I.E. (lucrările lui Kono, Nakajima, Ishii, Yoshino, Ishitani, Yamagiwa, Yamamoto etc.).

În al doilea război mondial, infecția A.I.E. s-a extins cuprinzând 10—15% din efectivele ecvine înregistrate în zonele enzootice și 1—3% în celelalte regiuni ale țării (96). Ca urmare, lupta pentru combaterea A.I.E. a fost organizată pe plan național. Până în 1972, baza diagnosticului A.I.E. a constituit-o examenul clinic, hematologic (siderocitemia) și histopatologic (200). Tehnica siderocitemiei inițiată de Ishii (96) a fost legiferată și a rămas valabilă până în anul 1972, când a fost adoptat testul serologic de imunodifuzie (Coggins).

Primele investigații serologice întreprinse în 1972 de Nakajima și col. (199), pe 2 000 cabaline, au stabilit o rată de prevalență de 1,4%.

Statele Unite ale Americii constituie zona de pe glob cu cele mai vechi focare de A.I.E. (329). În delta fluviului Mississippi boala este enzootică, cuprinzând câmpii întregi populate mai ales cu catiri la care evoluția infecției îmbracă un caracter cronic. Forme acute și focare enzootice largi se constată mai frecvent în zonele din perimetrul golfului Mexic (255). Școala americană are meritul incontestabil de a fi pus bazele profilaxiei active a A.I.E., prin lucrările inițiate de Coggins, Pearson, Kemmen, Hawkins etc. Pe baza testului I.D.-Coggins, oficial acceptat în S.U.A. din 1973, se practică o profilaxie activă anti-A.I.E., serodiagnosticându-se anual circa 600 000 solipede în 120 laboratoare specializate care utilizează un antigen și ser pozitiv standardizat (127 ; 155). Toate cazurile seropozitive se sacrifică sau izolează în așa fel ca să nu mai constituie surse de contaminare pentru cei 7 560 000 cai cît reprezintă șeptelul național al S.U.A. (81). Rata infectivității este apreciată la 1,5—10% (48) pentru majoritatea fermelor populate cu ecvine, dar în America Centrală ea atinge valori de 20—30% (58). Urmare a măsurilor instituite, prevalența A.I.E. este în continuă scădere : la 175 000 cai examinați serologic, în 1973 erau pozitivi 3,33% ; la 354 412 cai testați în 1974 doar 2,56% erau seropozitivi ; la 261 030 controlați în 1975 numai 1,57% au reacționat pozitiv ; la 790 107 cai verificați în 1976, indicele de pozitivitate reprezenta numai 1,28% (174), iar în 1977 numai 0,71% (225). Titrurile de infectivitate cele mai ridicate le furnizează de regulă cai aflați pe pășunile traversate de râuri din zonele calduroase

și mai ales din preajma mlaștinilor (de aici „swamp-fever“ = febra de mlaștină, sau A.I.E.)

Unele state federale americane au adoptat măsura care vizază blocarea extensiei A.I.E. prin admiterea la expoziții, târguri, concursuri etc., numai a cailor seronegativi la testul I.D.-Coggins. În acest fel, cu sprijinul statului, se acționează pentru combaterea A.I.E., permițându-se doar animalelor indemne să beneficieze de unele avantaje, inclusiv să circule pe căile publice (48). Așadar, cailor cu reacție pozitivă nu li se permite să se deplaseze dintr-o localitate în alta, cu atât mai mult dintr-un stat american în altul, exceptînd drumul spre abator sau domiciliul proprietarului, care își asumă răspunderea de a-l izola și supraveghea (30). Focarul infecțios se consideră stins și măsurile sanitare veterinare ridicate dacă 3 testuri serologice la interval de 30 zile sînt negative la toți caii rămași după ultimul caz letal.

Țările din Europa de est. În U.R.S.S., ca și în celelalte state socialiste est-europene, lupta contra A.I.E. s-a dus între anii 1950—1970 prin lichidarea cazurilor clinice și izolarea anemocraticilor (133). Noile principii de profilaxie și combatere s-au introdus treptat în aceste state începînd din 1971, respectiv din anul cînd Centrul de referințe de la Alfort (Franța) a pus la dispoziția laboratoarelor naționale reactivii necesari testului de diagnostic I.D.-Coggins.

Incidența A.I.E. în statele est-europene era estimată în 1976, la valori cuprinse între 1,6—15,3% (106). Cazurile evidente de A.I.E., respectiv cu forme clinice se sacrifică, iar cele anemolatente se testează serologic, hotărîndu-se în funcție de legislația sanitară veterinară a statului respectiv (232). În prezent, aproape toate statele din estul Europei și în mod deosebit U.R.S.S., Iugoslavia, Cehoslovacia, Polonia, România, Bulgaria, și Grecia, și-au prospectat efectivele ecvine și dispun de reactivi preparați din tulpinile de import sau indigene, cu care execută diagnosticul serologic al A.I.E. Dovadă în acest sens sînt rezultatele serologice publicate în lucrările lui Iurov și Sologub (106), Oleinik și col. (215) și Koleakov (133) în U.R.S.S.; Petrović și col. (230; 231; 232) în Iugoslavia; Celer (35) și Zakopol (332) în Cehoslovacia; Jivojin și col. (111), Istrate și col. (104) și Vior și col. (325), Chelermen și col. (41) în România; Tekerlekov și col. (294) și Nacev și col. (193) în Bulgaria; Papadopoulos (221) în Grecia.

11.4. PREVENIREA ȘI COMBATEREA A.I.E. ÎN ROMÂNIA

11.4.1. MĂSURI DE PREVENIRE

Măsurile de profilaxie anti-A.I.E. în România se bazează pe identificarea animalelor infectate prin testul I.D.-Coggins, izolarea tuturor seropozitivilor și sacrificarea celor cu simptome clinice. Astfel se realizează o profilaxie eficientă, respectiv o prevenire a extinderii infecției.

Baza profilaxiei anti-A.I.E., o constituie adoptarea testului I.D.-Coggins, care a fost preluat, în afara institutelor centrale de profil (I.C.V.B. Pasteur și L.C.S.V.D.) și de către laboratoarele județene în cadrul cărora este practicat ca examen de rutină.

Acțiunea de prospectare A.I.E. în România cuprinde animalele de mare valoare genetică și economică, respectiv caii care formează matca de reproducție din centrele de creștere, herghelii și stații de montă. De asemenea, sînt testate efectivele din hipodroame, manejuri, sector de stat, cooperatist și particular. Caii armatei se controlează serologic în paralel cu acțiunile întreprinse în sectorul de stat, ținînd cont de specificul unităților militare. Caii instituțiilor de seruri și vaccinuri se examinează serologic conform normelor prevăzute de protocoalele de preparare a produselor biologice.

În scopul prevenirii contaminării efectivelor indemne de A.I.E. este indicat să se acorde o atenție sporită achiziționării cabalinelor necesare pentru completarea efectivelor. În acest sens se recomandă a se procura cai din zonele geografice în care boala a evoluat, numai dacă au trecut cel puțin 6 luni de la ridicarea măsurilor sanitare veterinare (345).

Cabalinele noi introduse în unități vor fi în mod obligatoriu menținute în carantină profilactică timp de 60 zile¹, fiind examinate la jumătatea intervalului și la sfîrșitul lui, din punct de vedere clinic, hematologic și serologic. Carantina va fi organizată în adăposturi speciale, beneficiind de serviciile unui personal anume destinat pentru hrănirea și supravegherea animalelor izolate. Pășunatul, ca și activitățile de tracțiune, călărie etc., vor trebui programate separat pentru caii noi achiziționați, aflați în perioada de carantină.

¹ Cu toată că mai normal ar fi ca această perioadă să dureze 90 zile, adică limita maximă a perioadei de incubație.

Dacă în intervalul celor două luni de carantină profilactică apar cazuri de A.I.E. în lotul achiziționat, întreg efectivul de cai trebuie considerat contaminat și supus măsurilor de combatere.

Prospectarea incidenței A.I.E. în herghelii, depozite de armăsari, unități socialiste și militare va trebui asigurată prin testări serologice în mod diferențiat astfel :

— Cabalinele de mare valoare zootehnică din herghelii și hipodroame vor fi testate serologic, minimum o dată pe an (trimestrul IV).

— Armăsarii din depozite vor fi controlați cu 20—30 zile înainte de plecare în stațiunile de montă publică, iar seropozitivii vor fi excluși de la montă. Dacă situația nu poate fi rezolvată cu armăsari indemni din zonă, va trebui adoptată măsura însămînțărilor artificiale (30). În stațiunile de montă publică se impune ca armăsarii să fie trimiși numai după ce au fost controlați imunologic. Cu 20 zile înainte de înapoierea în depozite aceștia ar trebui retestați serologic. După ce s-au întors din stațiunile de montă, armăsarii vor fi supuși carantinării profilactice, timp de 60 zile cu testare serologică lunară. În caz că unul din aceste animale reacționează pozitiv, urmează să rămână mai departe în carantină fiind retestate la alte 30 zile. Dacă răspunsul este tot pozitiv, animalul va fi considerat infectat și supus măsurilor de combatere (după aprobările de rigoare).

Iepele, indiferent că aparțin sectorului socialist de stat, cooperatist sau unor proprietari particulari nu vor fi admise la montă, decât dacă sînt însoțite de un certificat sanitar-veterinar din care să rezulte că au fost testate serologic cu cel mult 10 zile înainte, iar rezultatul a fost negativ. Totodată, pentru a evita transmiterea infecției prin insecte hematofage de la iepele-mame la mînji, este indicat ca monta să fie organizată așa fel, încît fătările să aibă loc la sfîrșitul sezonului estival. În acest mod întărcările și separările mînjilor de mame s-ar putea efectua înaintea perioadei de urgență a insectelor hematofage (119).

Efectivele ecvine aparținînd cluburilor sportive trebuie testate serologic, de trei ori pe an (trim. I, II și IV) la 4 luni interval. Dacă unii din caii acestor cluburi participă la concursuri în străinătate, devine obligatorie testarea lor serologică și eliberarea certificatelor sanitar-veterinare, înainte de fiecare plecare la concursuri. Actul respectiv va trebui emis pe baza probelor recoltate cu cel mult 10 zile înainte de plecare. Caii procurați din România de diferite instituții sau persoane

particulare străine pentru performanță sau în scop economic, trebuie controlați serologic în funcție de pretențiile instituțiilor sau persoanelor cumpărătoare.

Cluburile străine care participă cu cai la concursuri în România ca și firmele care mențin cai temporar în custodie sau sînt în tranzit în țara noastră trebuie să prezinte certificate de sănătate pentru aceste animale, în care să fie specificat că au fost testate serologic cu 30 de zile înainte¹ de introducerea în țară și că rezultatele serologice au fost negative. În cazul în care unul din caii prezenți la concursuri, tranzit etc., manifestă semne clinice sau o suspiciune de A.I.E., este indicată efectuarea diagnosticului serologic pentru toți caii din lotul respectiv. Rezultatul seropozitiv va trebui adus la cunoștința clubului în cauză, care va fi obligat să transporte de urgență animalul respectiv în țara de origine. Pînă la îmbarcare, calul seropozitiv va trebui izolat.

Caii cluburilor române care au participat la concursuri în străinătate și s-au înapoiat în țară vor fi menținuți sub observație timp de 60 zile cu testare serologică lunară.

Caii de import, dovedindu-se adesea infectați cu virusul A.I.E., indicele de morbiditate al acestora fiind uneori ridicat (20), este necesar să fie însoțiți de un certificat sanitar-veterinar care să ateste că provin din zone indemne de A.I.E. și că la controlul serologic au prezentat un rezultat negativ cu 15 zile înainte de plecare.

Lista măsurilor de profilaxie anti-A.I.E., mai trebuie completată cu prevederea că : 1. în situațiile incerte de A.I.E., transfuziile sangvine și operațiile sîngeroase să fie evitate ; 2. cabalinele cu A.I.E., clinic exprimată să nu fie internate în spitale, dispensare sau infirmerii ; 3. serurile hiperimune preparate pe cai în scop imunoprofilactic să nu fie livrate unităților din teritoriu înainte de a se fi stabilit cu certitudine inocuitatea lor ; 4. aparatura de intervenție chirurgicală sau instrumentarul utilizat în practica imunizărilor și alergizărilor periodice să fie riguros sterilizat (este obligatorie utilizarea unică a acelor de seringă) ; 5. distanța între loturile de animale — anemolatente și indemne — aflate la păscut va trebui să fie de minimum 7 km (autorii sovietici au stabilit că incidența artropodelor hematofage este maximă cînd loturile de ecvine se află la 50—200 m (155), iar cercetătorii americani au arătat că itinerarul de zbor al tabanidelor într-o zi măsoară

¹ Normal ar fi ca acest termen să fie de 15 zile.

circa 4 mile (79); 6. în condiții de identificare a unor cazuri de A.I.E., să se interzică orice deplasări, mișcări de efective în cadrul unității sau a zonei contaminate (319) 7. finul strîns de pe terenuri pe care înainte de recoltare au păscut cabaline bolnave de A.I.E. este interzis a fi scos din unitatea contaminată (345).

11.4 2. MĂSURI DE COMBATERE

Anemia infecțioasă ecvină fiind o boală declarabilă și cu carantină obligatorie, conform prevederilor L.S./60/1974 (345) se impune ca unitățile socialiste de stat, cooperatiste și proprietarii particulari pe raza cărora s-au depistat cazuri de A.I.E., să instituie carantina de gradul III.

Măsurile de combatere a A.I.E., vizează în esență ruperea lanțului de transmitere a infecției virale, reprezentat de triada cal-insectă-cal, respectiv lichidarea surselor de infecție a mijloacelor de transmitere și protejarea animalelor receptive.

Eficiența măsurilor de combatere este condiționată de certitudinea diagnosticului, intransigența eliminării purtătorilor virali, carantina riguroasă și abatajul sau izolarea strictă.

Boala, o dată diagnosticată într-o zonă, impune măsuri de asanare diferențiată pentru fiecare animal în funcție de rezultatul examenului imunologic. Principal, în unitățile cu efective de cabaline infectate, testarea serologică este necesară la fiecare 30 zile cu mențiunea ca dacă în acest interval apar cazuri clinice sau suspecte, de A.I.E., acestea urmează să fie izolate. Deplasările sau mișcările de efective ecvine între grajduri sau unități vor fi interzise. Caii izolați vor fi supuși examenului clinic și hematologic bilunar precum și termometriei bicotidiene timp de 90 zile. Dacă după acest interval rezultatele serologice, hematologice și clinice nu confirmă suspiciunea de infecție, animalele pot fi reintroduse în efectivele indemne.

Pentru o combatere rațională a A.I.E., în unitățile cu efective hipo se impun măsuri diferențiate în funcție de gravitatea infecției, astfel :

(a) animalele serologic pozitive sau bolnave clinic, inclusiv mînjii neîntărcați ai iepelor serologic pozitive sau bolnave vor forma un prim lot ;

(b) solipelele suspectate de infecție, prezentînd simptome neconcludente, inclusiv mînjii întărcați care au provenit din

iepe bolnave sau suspecte de îmbolnăvire vor constitui al doilea grup ;

(c) caii suspecti de contaminare, clinic sănătoși, dar care au fost cazați în același grajd sau au păscut la un loc cu animalele bolnave de A.I.E., ori au venit în contact cu ele în ultimele 3 luni, vor fi incluse într-o a treia categorie.

Măsurile de combatere aplicabile acestor 3 grupe sînt diferite, astfel :

— animalele din lótul (a) vor fi supuse diagnosticului de confirmare prin testul I.D.-Coggins, după care se va cere forului tutelar aprobarea de sacrificare, urmînd a se atribui despăgubiri materiale în funcție de valoarea lor la data sacrificării și de sumele alocate de organele împuternicite în acest sens ;

— ecvinele din lotul (b) vor fi izolate și testate serologic bilunar, concomitent cu efectuarea examenelor clinice, hematologice și termometria lor bicotidiană timp de 90 de zile. Dacă două examene serologice sînt pozitive, animalul se consideră infectat și se aplică măsuri de combatere (sacrificarea sau izolarea lor strictă). Dacă serodiagnosticul repetat este negativ, caii se scot din observație. Cînd rezultatele serologice diferă, animalele se mențin în observație pînă la clarificarea situației sanitare ;

— cabalinele din lotul (c) vor fi testate serologic la fiecare 60 zile urmînd a se decide în funcție de rezultatele acestor examene : sacrificarea (după examenul serologic de confirmare și aprobarea MAIA) a celor ce se dovedesc pozitive la două examene serologice consecutive și eliberarea celor serologic negative.

Carnea rezultată din sacrificările animalelor anemolatente riguros sterilizată în prealabil ar putea fi atribuită consumului public sau fabricilor de preparate din carne, așa cum se procedează și în alte state¹, ea întrunind toate dezideratele alimentare și neavînd nici o contraindicație. S-ar realiza astfel un triplu obiectiv : profilactic, economic și alimentar (231). Se exceptează produsele de carne care prezintă modificări organoleptice evidente și care vor fi destinate industriei producătoare de făinuri furajere.

În cazul în care există unități socialiste, cooperatiste, militare sau proprietari de cai cu efective mici de cabaline, care

¹ În Iugoslavia, 93% din reagenți sînt destinați industriei cărnii (231). Veniturile anuale iugoslave din exportul de cai și produselor lor de carne se cifrează la 26 milioane dolari (232).

nu dispun de posibilități de izolare a animalelor bolnave sau infectate, este preferabil ca aceste animale să fie sacrificate, evitându-se în acest mod difuzarea virusului.

Sacrificarea cailor cu A.I.E. va fi executată conform normativelor legale numai în unități specializate. Necropsia cadavrelor de A.I.E. se va efectua fără jupuirea pielii animalului, în locurile stabilite de către forul tutelar (unități industriale de producerea făinurilor furajere, săli de autopsie, cimitire de animale, puț sec). Transportul cadavrelor de cai cu A.I.E. va fi organizat numai cu mijloace auto adecvate și în extremis cu tracțiune bovină. În caz că acest transport nu este posibil, cadavrul va fi îngropat la doi metri adâncime între două straturi de clorură de var. În final, se va proceda la dezinfectia terenului din perimetrul gropii ca și a echipamentului de protecție, instrumentarului sau ustensilelor care au servit la necropsie.

11.4.3. ASANAREA FOCARELOR DE A.I.E.

În cadrul acțiunilor de asanare se urmărește eliminarea rezervorului de virus prin depistarea, izolarea și lichidarea cazurilor de infecție (metoda prin extracție) sau prin măsura radicală (stamping-out). Operația de asanare se desfășoară după carantinarea, depistarea periodică a reagenților, dezinfectia și dezinsecția urmate de stingerea focarului care reprezintă etapele de parcurs.

Carantinarea. Rolul carantinei în A.I.E., a fost precizat de Johnson (112) care arată că în controlul și eradicarea bolii, carantina și abatajul joacă un rol de prim ordin.

Spațiul de carantinare pentru solipele bolnave sau suspecte trebuie supus unor măsuri restrictive în sensul că din zona de carantinare să nu fie scoase animalele sub nici o formă și pe toată durata intervalului prescris. De asemenea, nu va fi admisă trecerea prin această zonă a cabalinelor indemne aparținând altor unități.

Artropodele vectoare vor trebui combătute prin toate mijloacele de dezinsecție disponibile (fizice, chimice, mecanice) (fig. 35). Rooney (254) susține că o primă măsură de asanare a focarelor de A.I.E., o constituie combaterea insectelor vectoare, aceasta fiind o cale mai eficientă decât izolarea cailor infectați.

Monta cabalinelor bolnave sau suspecte de boală nu va fi admisă în intervalul de carantinare (iepele sănătoase, respectiv

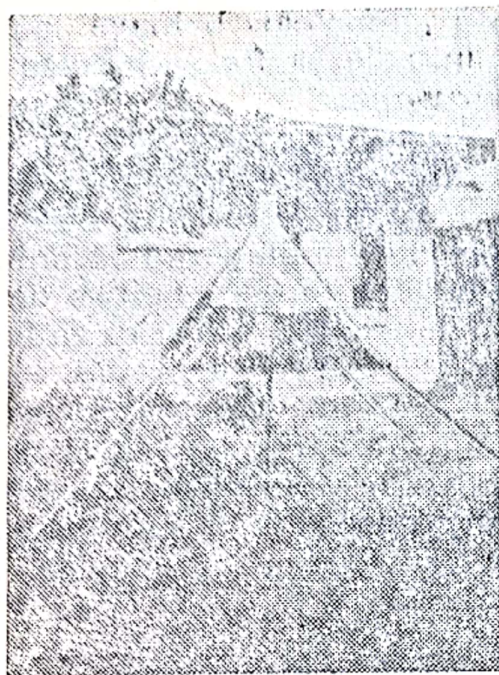


Fig. 35 — Capcană destinată captării tabanidelor, realizată de Adkins și col. 1972 (după Coggins, 1978)

serologic negative vor fi montate numai cu armăsari clinic sănătoși și negativi la testul I.D.-Coggins).

Furajele recoltate de pe terenuri pe care înainte au păscut animale bolnave sau suspecte de A.I.E., nu vor putea fi scoase din zona contaminată și nici transportate sau predate altor unități cu efective ecvine indemne.

Animalele infectate asimptomatice vor fi supuse operațiilor chirurgicale numai cu instituirea măsurilor de precauție spre a nu difuza virusul patogen.

Harnașamentul de tracțiune, călărie, samar și contenție nu va fi schimbat de la un cal bolnav sau suspect la altul indemn. Pansajul va fi efectuat numai cu perii individuale, țeșalele fiind scoase complet din uz.

Animalele suspecte de boală și suspecte de contaminare pot fi utilizate la diferite activități în atelaje formate din astfel de subiecte și li se poate permite să pască pe terenuri special destinate.

Armăsarii sănătoși (seronegativi la testul I.D.-Coggins) aflați în depozitele în care s-au identificat cazuri de A.I.E., pot fi trimiși în stațiuni de montă cu condiția ca acolo să fie supravegheați clinic și controlați serologic în fiecare lună. În caz că între aceștia apar cazuri seropozitive, iepele montate trebuie controlate imunologic în mod periodic, urmînd a se hotărî în funcție de rezultatele testărilor.

Măsurile de carantină pot fi ridicate după 3 rezultate serologice negative la întregul efectiv, executate la interval de 60 zile, adică în total după 6 luni de la sacrificarea sau moartea ultimului caz de A.I.E. și după ce a fost efectuată dezinfecția finală.

Dezinsecția. Pentru combaterea insectelor hematofage (tabanide, stomocși, țînțari etc.), pe timpul sezonului estival, este necesar să se procedeze la dezinsecția periodică a corpului ani-

malelor, adăposturilor și perimetrelor acestora, prin pulverizări de insecticide organice de sinteză, respectiv substanțe organo-fosforice ca : Dipterex sol. 1—2%, Neguvon 1—2% (în apă caldă), Clorofos 2—4%, Carbetox emulsie 1—1,5% etc. Cuantumul necesar se calculează la 1 litru soluție pentru 20 m². Operația de dezinsecție se va executa conform instrucțiunilor din L.S.V. nr. 40/1974, pag. 666—668.

Dezinfecția. După Popovici și col. (236), dezinfecția în A.I.E. poate fi : a. *profilactică*, respectiv practică în adăposturi cu animale sănătoase în care se execută o curățenie mecanică prealabilă și apoi dezinfecția propriu-zisă cu sol. NaOH 2% ; b. *curentă*, adică efectuată în adăposturi de izolare sau preizolare, din 10 în 10 zile, după curățenia mecanică când se aplică sol. NaOH 4% ; c. *finală*, executată de 3 ori la 10 zile interval după ce ultimul animal a fost lichidat, constând într-o curățenie minuțioasă a adăpostului urmată de dezinfecția cu sol. NaOH 4% sau formol 4% a ustensilelor și obiectelor de grajd ca și a terenului din jur.

S-a constatat că dezinfectantele se dovedesc deosebit de active dacă sînt utilizate în soluții fierbinți sau calde. De aceea, se folosesc ca dezinfectante hidroxidul de sodiu 4% în soluție fierbinte 80°C sau formolul 2—4%¹, în apă caldă (25—30°C).

Instrumentarul metalic, utilizat la tratamentul animalelor bolnave sau suspecte, precum și la autopsierea cadavrelor, ca și ustensilele de hrănire, pansaj și contenție vor fi dezinfectate prin autoclavare, fierbere sau flambare. În caz că aceste utilaje sînt confecționate din lemn vor trebui introduse într-o soluție dezinfectantă de hidroxid de sodiu 2—4% sau formol 4% în care vor fi menținute 24 de ore.

Materialele textile (halate, șorturi, bonete) se vor îmbiba pentru două ore într-o soluție de carbonat de sodiu 2%, după care vor fi supuse autoclavării sau fierberii timp de o oră. Harnașamentul din piele și pîslă va fi fricționat cu soluție de formol 4—5%, după care va fi uscat și gresat. Termometrele maxime utilizate la caii bolnavi sau suspecti de A.I.E., vor fi menținute timp de 10 minute în soluție virulicidă de formol 5%, după care se vor spăla cu apă curentă și reutiliza.

Adăposturile sau boxele în care au fost cazați caii bolnavi sau suspecti de A.I.E. vor fi curățate mecanic, dejectele și res-

¹ Dacă la soluția de formol 2% se adaugă amoniac 2%, virusul A.I.E. nu numai că nu se inactivează, ci își recîștigă potențialul infectant (188).

turile furajere fiind scoase și incinerate, după care se vor dezinfecța de 3 ori la 10 zile interval cu sol. fierbinte de NaOH 4% sau formol 5%, urmînd ca după 3 ore să fie spălate cu apă curentă.

Stingerea focarului infecțios. Stingerea focarului de infecție A.I.E. incumbă o responsabilitate majoră, cunoscute fiind consecințele unor măsuri pripite. Este tipic în acest sens cazul relatat de Toma (314) cînd o iapă eronat apreciată ca seronegativă, aceasta aflîndu-se de fapt la limita inferioară a titrului seropozitiv (singura rămasă dintr-un efectiv lichidat ca urmare a A.I.E.), a reinfectat după 6 ani, caii noi achiziționați cu care s-a repopulat adăpostul.

Oleinik (215) arată că într-o fermă formată exclusiv din cabaline, hotărîrea de a declara stins focarul infecțios și a se introduce noi animale a fost posibilă după ce 3 ani consecutiv au fost eliminate mereu cazurile de A.I.E., detectate prin testare serologică.

De aceea, înainte de a declara stins focarul de infecție, organele împuternicite trebuie să fie convinse de eliminarea tuturor surselor de infecție, ceea ce nu este deloc simplu.

Ca mod de procedură, după lichidarea ultimului cal bolnav sau purtător de virus A.I.E., se va executa dezinfecția finală atît în adăpostul propriu-zis, cît și în perimetrul acestuia, concomitent cu a ustensilelor de pansaj, hrănire, contenție ca și a uneltelor de curățire.

Stingerea focarului de infecție și ridicarea măsurilor sanitare-veterinare se efectuează cînd caii rămași nu au mai prezentat simptome care să suspecte A.I.E., iar răspunsurile serologice, la toți acești cai, efectuate de 3 ori la 60 zile interval, au fost constant negative. În unitățile în care au fost lichidați (morți, uciși) toți caii cu A.I.E., repopularea grajdurilor este posibilă după 3 dezinsecții și dezinfecții generale, repetate la interval de 30 zile (345).

12. INFECȚIA UMANĂ CU VIRUSUL A. I. E.

Ishii (98) descrie primele două cazuri de A.I.E., — unice de altfel — publicate în literatura de specialitate, ca fiind consecința infecției accidentale cu virusul A.I.E.

Primul caz este al lui Luhrs (161) care s-a contaminat incidental în 1920 cu virusul A.I.E., el însuși descriindu-și infecția. Simptomatologia a constat în: ridicarea temperaturii corporale, scaune diareice ușor sangvinolente, cefalee, scăderea ponderii corporale (slăbire progresivă) emaciere și un sindrom anemic instalat după primele zile. La câteva săptămîni, apare o erupție cutanată care se extinde treptat din zona ombilicală pînă la fese. După 2 1/2 ani de la debutul clinic, autorul își recoltează o probă de sînge din care 1 ml este inoculat unui cal indemn. Simptomele clinice la acest animal apar după o incubatie de 40 zile. La 4 luni de la debutul infecției la cal i se recoltează acestuia într-o zi 5 ml sînge care se inoculează unui al doilea cal, iar în ziua următoare o altă probă care după ce este filtrată este injectată unui al treilea cal. Cel de al doilea cal infectat prezintă simptome clinice după 21 zile, iar al treilea după 26 zile.

Următorul caz de infecție umană este relatat de Peters (228) care în 1924 a căzut de asemenea victimă unei infecții accidentale. Simptomele au constat și în acest caz în: scaune diareice sangvinolente (coproragii), erupție cutanată herpetiformă în zona ombilicală, cefalee prelungită cu localizare accentuată în zona occipitală, lumbago, edeme palpebrale, apetit diminuat, sindrom anemic și emaciere. Pe parcursul a 2 ani de la debutul clinic s-au recoltat și în acest caz 3 probe de sînge la diferite intervale care au fost inoculate la cai receptivi. Toți caii au prezentat simptome de A.I.E. în formă clinică și au sucombat cu leziuni tipice de boală.

După aceste două cazuri de A.I.E. la om, confirmate prin bioprobă au mai fost relatate în 1925 de Preller (240) alte două cazuri de infecție umană la asistentele clinicii profesorului

Oppermann din Hanovra. Acestea au prezentat simptome suspecte de A.I.E., dar confirmarea A.I.E. nu a fost atestată prin bioprobă, astfel că aceste cazuri rămân incerte.

La rândul lor, Stein și Mott (279) comunică în 1946 alte două cazuri de suspiciune a A.I.E., tot la femei, care nu veniseră în contact cu caii bolnavi, dar prezentau simptome adecvate. Bioproba efectuată în aceste cazuri a infirmat A.I.E.

În context, Ishii (98) și Henson și col. (83) arată că este surprinzător cum din 1924 nu au mai apărut alte cazuri de A.I.E. la om, atât în rândul personalului laboratoarelor de profil cât și al crescătorilor de cai, care au venit în contact cu virusul A.I.E. în activitatea de cercetare și diagnostic și respectiv de supraveghere a animalelor bolnave.

Transmiterea A.I.E. la om prin consumul cărnii de cal în diferite state în care acesta este practicat, este exclusă, atât din cauza prelucrării termice, care inactivează virusul patogen, cât și ca urmare a inactivării acestuia prin acțiunea acidului clorhidric din sucul gastric.

Riscul infecției rămâne totuși în cazul terapiei cu ser anti-limfocitar, practică curent în condițiile de transplant organic, dacă acest ser a fost preparat pe cai anemolatenți, nedetectabili prin probe riguroase de control. Până în prezent nu a fost înregistrat nici un astfel de caz. De aceea, încadrarea A.I.E. în grupul maladiilor zoonotice minore rămâne o problemă în dreptul căreia va trebui să persiste încă un mare semn de întrebare.

ÎNCHEIERE

Au trecut 76 de ani de cînd Vallé și Carré (324) au stabilit că agentul etiologic de A.I.E. este un virus filtrabil. Cercetările în acest domeniu par după Ishitani (100) a fi atins stadiul maturității. Într-adevăr, una din barierele majore care stau în fața oamenilor de știință, spre a învinge acest flagel a fost depășită. Este evident vorba în acest sens de realizarea diagnosticului imunologic al A.I.E. Spre a putea atinge țelul final al cercetării, mai sînt necesare eforturi suplimentare spre a depăși celelalte obstacole. Astfel, după Mathéka și col. (172) mai trebuie efectuate cercetări privind constituția virusului A.I.E., a sintezei, multiplicării și persistenței lui în țesuturile animale, precum și asupra imunosupresiei. De asemenea, se impune a fi adîncită cercetarea privind testul de infecțiozitate „in vitro” precum și identificarea unor medicații specifice în tratamentul A.I.E. Concomitent se impun eforturi sporite pentru prepararea unui vaccin anti-A.I.E., care să fie în măsură să jăguieze de la început orice tendință de eclozare a procesului infecțios.

Depășirea obstacolelor enunțate, alături de succesul metodologiei de diagnostic imunologic, de care omenirea dispune în prezent, constituie cheazășia conturării realiste a dezideratului suprem în profilaxia A.I.E. : eradicarea acestui grav flagel.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adameşteanu, I. — citat de (272)
2. Alegren, A. — Bull. off. int. epiz., 1951, 36, 312
3. Aleraj, Z. şi col. — Vet. Arhiv., 1962, 2, 32, 265
4. Altara, J. — Bull. off. int. epiz., 1951, 36, 232
5. Anginiard, R. — Rec. Méd. Vét., 1859, 36, 639
6. Arakawa, S. şi col. — Yokohama med. Bull., 1957, 8, 48
7. Archer, B. şi col. — J. virol., 1977, 22, 1, 16
8. Baba, A., I. şi col. — Simpoz. „Aspecte morfol. normală şi patol. la animale crescute în sistem industrial, Bucureşti, 7—8 dec., 1979
9. Balozet, L. — C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 62
10. Balozet, L. — C. R. Soc. Biol., 1936, 122, 213
11. Bankier, J. C. — Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1945, 9, 197
12. Banks, K. L., Henson, J. B. — Fedn., Proc., 1969, 28, 752
13. Banks, K. L., Henson, J. B. — Inf. Immun., 1973, 8, 679
14. Banks, K. L. — Inf. Immun., 1975, 12, 1219
15. Barnett, D. — Proc. 72 th Ann. Meet. US. Anim. Hlth. Ass. 1972, 231
16. Barta, V., Issel, C. J. — Am J. Vet. Res., 1978, 39, 1856
17. Băieşu, I., Bran, L. — Boli inf. anim. domest. (boli vitrotice), Edit. Didact. Pedag., Bucureşti, 1965, 146
18. Beller, K., Traub, E. — Arh. Wiss. u. Bakt. Tierheilk, 1942, 77, 411
19. Blood, D. C., Henderson, J. A. — Veterinary Medicine 4 th. Edit. Bailliere Thindall, Londra, 1974, 466
20. Böhm, H. O. — Dt. tierärztl. Wschr., 1976 b, 82, 184
21. Böhm, H. O. — Die Blauen Heften, 1976, 56, 259
22. Böhm, H. O., Kerstern, N. — Tierärztl. Umschau, 1976, 32, 2, 55
23. Böhm, H. O. — Dtsche. Tierärztl. Wschr., 1979, 86, 6, 228
24. Böhm, H. O. şi col. — Tierärztl. Umschau, 1979, 34, 5, 300
25. Boulanger, P. şi col. — Can., J. Comp. Med., 1972, 36, 2, 116

CUPRINS

PREFATA	3
1. GENERALITĂȚI	5
1.1. Definiție.	5
1.2. Terminologie internațională	5
1.3. Istoric	6
1.4. Răspândire geografică	7
1.4.1. Prevalența A.I.E. în diferite state	8
1.4.2. Retrospectivă A.I.E. în România	9
1.5. Pierderi economice	10
2. ETIOLOGIE	12
2.1. Considerații taxonomice	12
2.2. Morfologia virusului	13
2.3. Compoziția chimică a virusului	15
2.4. Acțiunea factorilor fizici, chimici și biologici asupra virusului A.I.E.	16
2.5. Caracteristicile tulpinilor virale	17
2.5.1. Modificări de virulență	17
2.5.2. Pluralitatea virală	17
2.5.3. Tulpini de referință	18
2.6. Persistența virală	19
2.7. Cultivarea virusului	21
2.7.1. Pe animalul viu	21
2.7.2. În culturi celulare	21
2.8. Proprietăți antigenice. Tipuri de antigene	23
2.8.1. Antigene pentru reacția de neutralizare	23
2.8.2. Antigene pentru reacția de precipitare, fixare a complementului imunofluorescență	24
2.8.2.1. Antigenul G	24
2.8.2.2. Antigenul C	25
2.8.2.3. Extragerea antigenului din țesuturile celulare	26
2.8.2.3.1. Extragerea antigenului din țesuturi celulare cu încărcătură antigenică ideală	26

2.8.2.3.2. Tehnici de extragere a antigenului din organele slab reactive	30
2.8.2.4. Tehnici de obținere a antigenului din culturi de celule	32
3. EPIZOOTOLOGIE	33
3.1. Generalități	35
3.2. Receptivitate	36
3.3. Surse de infecție	37
3.4. Căi de transmitere a virusului	39
3.4.1. Transmiterea pe cale cutanată	39
3.4.2. Transmiterea prin artropode hematofage	39
3.4.3. Transmiterea iatrogenă	42
3.4.4. Transmiterea pe cale transplacentară	42
3.4.5. Transmiterea prin mucoasa genitală	43
3.4.6. Transmiterea prin contact (coabitare)	43
3.4.7. Transmiterea pe cale digestivă	44
3.4.8. Transmiterea pe cale respiratorie și oftalmică	44
3.5. Factori epizootologici	45
3.5.1. Factori depinzând de individ	45
3.5.2. Factori depinzând de colectivitate	45
3.5.3. Factori pedo-climatici și de stress	46
4. PATOGENEZA	49
4.1. Generalități	49
4.2. Cinetica infecției	49
4.3. Distribuția virusului în țesuturi	50
4.4. Mecanismul patogenezii virale	51
4.4.1. Rolul complexelor imune	54
4.4.2. Fenomene imunopatologice	55
4.5. Portajul și excreția virală	56
5. TABLOU CLINIC	57
5.1. Generalități	57
5.2. Perioada de incubație	57
5.3. Forme clinice	58
6. TABLOU ANATOMO-HISTO-PATOLOGIC	65
6.1. Generalități	65
6.2. Modificări anatomice	65
6.3. Modificări histologice	68
7. IMUNITATEA ÎN ANEMIA INFECTIOASĂ ECVINĂ	73
7.1. Generalități	73
7.2. Imunitate umorală și celulară	73
7.3. Răspunsul imun. Diferite forme de anticorpi	74

7.4. Imunizarea artificială	77
7.4.1. Imunogeneza. Vaccinuri	77
7.5. Fenomene imunitare	80
8. DIAGNOSTIC	82
8.1. Generalități	82
8.2. Diagnostic clinico-anatomic	82
8.2.1. Date anamnetice	83
8.2.2. Teste clinice de diagnostic	83
8.2.3. Investigarea leziunilor anatomice	85
8.2.4. Semnificația diagnostică a simptomelor și leziunilor	86
8.3. Diagnostic diferențial	87
8.4. Diagnostic paraclinic	90
8.4.1. Produse patologice pentru examen de laborator	90
8.4.2. Examen hematologic	90
8.4.3. Examen biochimic	97
8.4.4. Examen histologic	98
8.4.5. Probe biopsice	100
8.5. Diagnostic experimental (bioproba)	103
8.5.1. Parametri metodologici	104
8.5.2. Bioproba simplă	105
8.5.3. Bioproba de pasaj	105
8.5.4. Bioproba de grup	105
8.5.5. Bioproba încrucișată	106
8.5.6. Infecția experimentală pe alte specii de animale	106
8.6. Diagnostic imunologic	109
8.6.1. Testul de imunodifuzie (I.D.-Coggins).	109
8.6.1.1. Baza teoretică și factorii care influențează testul	111
8.6.1.2. Ingrediente și echipament de lucru	111
8.6.1.3. Execuția practică a testului	115
8.6.1.4. Citirea rezultatelor. Tipuri de reacție	117
8.6.1.5. Înregistrarea rezultatelor	122
8.6.1.6. Interpretarea și semnificația rezultatelor	122
8.6.1.7. Valoarea reacțiilor ID-negative în atestarea indemnității de A.I.E.	124
8.6.2. Variante ale testului I.D.-Coggins	127
8.6.2.1. Testul de microimunodifuzie	127
8.6.2.2. Testul de imunodifuzie-inhibare	128
8.6.3. Reacția de fixare a complementului (R.F.C.) și reacția de inhibare a fixării complementului (R.I.F.C.)	129

8.6.4. Tehnica imunofluorescenței indirecte (I.F.I.)	131
8.6.5. Testul de seroneutralizare	134
8.6.6. Alte teste serologice	135
8.6.7. Interrelația diagnostică. Examenul imunologic-morfopatologic	135
9. PROGNOTIC	137
10. TRATAMENT	139
11. PROFILAXIE ȘI COMBATERE	141
11.1. Generalități	141
11.2. Baza sistemului general de profilaxie și combatere	142
11.3. Sisteme naționale de profilaxie și combatere	143
11.4. Prevenirea și combaterea A.I.E. în România	148
11.4.1. Măsuri de prevenire	148
11.4.2. Măsuri de combatere	151
11.4.3. Asanarea focarelor de A.I.E.	153
12. INFECȚIA UMANĂ CU VIRUSUL A.I.E.	157
INCHEIERE	159
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	160

Redactor : ing. NATALIA DIACONESCU
Tehnoredactor : EUGENIA CERNEA

*Bun de tipar : 25.06.1981. Apărut 1981.
Coli editoriale 9,83. Coli de tipar 11.
Planșe 1.*

Intreprinderea Poligrafică Oltenia
Str. Mihai Viteazu nr. 4 Craiova
Republica Socialistă România
Comanda nr. 38

